

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ГЕМАТОЛОГИИ

**Материалы научно-практической конференции
с международным участием
(Гомель, 15–16 сентября 2011 года)**

ПРИЛОЖЕНИЕ № 2

к № 2 (28) 2011

журнала «Проблемы здоровья и экологии»

Учредитель — учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Главный редактор: Лызиков Анатолий Николаевич

Редакционная коллегия: Н. Н. Климович (Минск), Т. И. Козарезова (Минск), А. А. Козловский (Гомель), И. И. Мистюкевич (Гомель), С. А. Ходулева (Гомель), И. А. Чешик (Гомель).

Редакционный совет: О. В. Алейникова (Минск), С. А. Васильев (Москва), Гритта Янка Шауб (Германия), В. В. Дмитриев (Минск), В. А. Змачинский (Минск), С. И. Кривенко (Минск), Е. Г. Маляева (Гомель), Н. Ф. Миланович (Минск), Л. А. Смирнова (Минск), А. Н. Усс (Минск).

Адрес редакции:

ул. Ланге, 5, 5246000, г. Гомель.

Телефоны: главного редактора — 74-10-62,

заместителей главного редактора — 74-21-78, 74-21-60, 74-17-80.

E-mail: plotkoN24@rambler.ru

Свидетельство о государственной регистрации средств массовой информации № 1241 от 08.02.2010, выданное Министерством информации Республики Беларусь.

Включен в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований по медицинской отрасли науки (приказ Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 04.08.2005 г., № 101) и для опубликования результатов диссертационных исследований по биологической отрасли науки (приказ Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 13.02.2007 г., № 25).

Издатель — Учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет».

Секретариат: *Н. И. Шолохова, С. М. Поладьева*

Редактор: *О. В. Кухарева, С. Н. Козлович*

Компьютерная верстка: *С. Н. Козлович*

Подписной индекс: 00550 — для индивидуальных подписчиков; 005502 — для организаций.

Подписано в печать 25.08.2011. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Усл. печ. л. 12,09. Тираж 200 экз. Заказ 310.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0549419 от 08.04.2009. ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель.

© Учреждение образования
«Гомельский государственный
медицинский университет», 2011

СОДЕРЖАНИЕ

М. Ю. Аношина, П. В. Юценко, В. И. Семеняка, М. В. Яговдик, Е. В. Аверьянов, С. В. Бурнаева, А. В. Асса Влияние степени метаболической интоксикации на показатель индивидуального восприятия времени у больных гемофилией	16
Н. А. Баилакова, Д. В. Шубенок, З. И. Кравчук, С. П. Марцев, Т. Д. Тябут Диагностическая значимость лабораторных маркеров антифосфолипидного синдрома при системной красной волчанке.....	18
С. А. Васильев, В. Л. Виноградов, Е. Б. Орел, А. Л. Берковский, Е. В. Сергеева, А. В. Мазуров, З. К. Карабудагова Наследственная микротромбоцитарная тромбоцитопатия: диагностика и лечение.....	20
Е. П. Вашкевич, Т. В. Шман Определение экспрессии маркера CD107a для оценки противоопухолевой активности цитотоксических лимфоцитов.....	22
Е. В. Дзюба Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток в лечении хронического миелолейкоза	24
В. В. Дмитриев, А. М. Какунин, И. А. Дунаев, В. М. Захаревич Алгоритм распознавания синдрома системного воспалительного ответа при фебрильной нейтропении у детей со злокачественными новообразованиями и гемобластомами.....	26
В. В. Дмитриев, И. А. Дунаев Приобретенные нарушения свертывания крови как причина геморрагических осложнений на этапах программного лечения детей с солидными опухолями и лейкозами	28
Е. В. Зуховицкая, О. П. Чайковская, Н. Ф. Василевская, Ю. Н. Селило Результаты применения иматиниба (гливек) в лечении больных хроническим миелолейкозом.....	30
И. А. Искров, А. Л. Усс, В. В. Смольникова, Д. Г. Цвирко, В. А. Змачинский Поддерживающая терапия ремиссии у пациентов с множественной миеломой	33
З. К. Карабудагова, С. А. Васильев, В. Л. Виноградов, А. А. Козлов, Е. Е. Ефремов, Г. Ю. Белинин Аутофибронектин-тромбоцитарный концентрат в лечении трофических поражений кожи у пациентов с геморрагическими васкулитами и ревматоидным артритом.....	36
Н. Н. Климкович, Т. И. Козарезова, В. В. Смольникова, Л. В. Колбаско, Д. И. Суворов, И. А. Искров Аберрантность иммунофенотипа клеток костного мозга при первичных миелодиспластических синдромах	37
Т. И. Козарезова, Н. Н. Климкович, В. И. Лагунович-Черепко, Г. Н. Родионова, В. И. Смычек, В. В. Голикова Медицинская реабилитация детей с миелоидными неоплазиями	40
Е. Л. Козлова, Н. Н. Климкович Факторы риска развития геморрагического синдрома в неонатальный период	42
Ю. В. Котлинская, К. В. Котлинский, С. Т. Акалович, А. В. Воробей, Ю. Н. Орловский, Т. М. Дорошенко Растворимая форма рецептора Интерлейкина-8 CXCR2 в качестве маркера вовлечения нейтрофильных лейкоцитов крови человека в локальный воспалительный процесс.....	45
К. В. Котлинский, Ю. В. Котлинская, Н. Н. Войтенко Стимуляция синтеза Интерлейкина-8 в культуре моноцитов под действием растворимого рецептора Интерлейкина-8 CXCR2.....	48
С. И. Кривенко, А. Л. Усс, Н. И. Дедюля Опыт и перспективы клинического применения мезенхимальных стволовых клеток	51

С. И. Кривенко, Е. А. Назарова, Е. А. Селезнева, А. А. Коритко, Н. И. Дедюля, А. Л. Усс, В. В. Смольникова, Е. С. Бузук Трансплантат мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани: получение, стандартизация и использование	54
Е. А. Кузьмич, В. А. Змачинский, Н. Ф. Миланович, Н. А. Новоселова Эффективность сочетанного применения гемопоэтических факторов роста после трансплантации стволовых гемопоэтических клеток	57
О. Г. Лютаревич, С. И. Кривенко, М. В. Белевцев Интерлейкин-6 как прогностический фактор при остром миелобластном лейкозе у взрослых	59
Н. Ф. Миланович Современные подходы к лечению хронического лимфолейкоза: место ритуксимаба в клинической практике	61
Н. Ф. Миланович, В. И. Левин, А. Л. Усс, Г. В. Семенов Нахождение донора стволовых клеток в зависимости от распределения параметров антигенов системы HLA в популяции больных	64
Л. В. Мовчан, Т. В. Шман Анализ количества клеток с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ в качестве потенциальных лейкоэмических стволовых клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей	66
О. М. Морозова Алемтузумаб в лечении больных с хроническим лимфолейкозом	69
И. А. Никитина, А. И. Грицук Изменения топологии тимоцитов и показателей энергетического обмена тимуса в ближайшие сроки после облучения	71
Ж. В. Пешняк, Г. А. Шпак, Л. А. Смирнова, В. В. Рачицкая, А. Л. Трухан, Ю. В. Устинович, Е. М. Тумар, З. И. Кравчук Роль аквапорин-зависимых мембранотранспортных механизмов в регуляции структурно-функциональных характеристик эритроцитов при анемиях различного генеза	74
И. Н. Прокопенко Особенности миелопролиферации при миелофиброзе с миелоидной метаплазией у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в результате аварии на Чернобыльской АЭС	76
И. П. Ромашевская, Н. Н. Савва, Н. П. Литвинко, О. В. Алейникова Острый миелобластный лейкоз, развившийся после терапии злокачественного новообразования или приобретенной апластической анемии в детском возрасте	79
Л. А. Смирнова, З. И. Кравчук, Ж. М. Козич Н- и L-ферритины при лейкозах	81
А. Ю. Старцева, Е. А. Янушевская, А. Л. Усс, С. И. Кривенко Практические аспекты подбора донора для неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток	83
Н. Н. Третьяк, Н. В. Горяинова, Е. А. Киселева, А. И. Коваль, М. Ю. Аношина, О. В. Басова, А. М. Вакульчук, Т. П. Перехрестенко, В. Н. Мнищенко Эффективность лечения острого миелобластного лейкоза с использованием протокола FLAG	85
А. Л. Усс, В. С. Кушниренко, Н. Ф. Миланович Состояние и перспективы гематологической службы в Республике Беларусь	87
Е. А. Федоровская, Е. А. Мельник, Н. К. Скачкова, А. П. Рыбальская, Л. Н. Немировская Возбудители инфекционно-воспалительных осложнений у больных острой миелоидной лейкемией	90
С. О. Шаропова, А. С. Романицова, А. В. Тарасова, Т. А. Узлова, А. С. Филиппик, М. В. Белевцев, Н. Н. Савва Анемия Фанкони у детей: клиническая характеристика и спектр вариаций в гене FANCA	92
С. О. Шаропова, А. А. Мигас, Т. А. Узлова, Л. Н. Бышинёва, М. В. Белевцев Генотип-фенотипическая характеристика пациентов с синдромом Вискотт-Олдрич	95
В. М. Шмелева, Н. Б. Салтыкова, Л. П. Папаян Нарушения в системе гемостаза при гипергомоцистеинемии	97
Ж. Л. Сухих, М. В. Штонда Ведение пациентов с железодефицитными анемиями участковым терапевтом	100

CONTENT

M. Yu. Anoshina, P. V. Yuschenko, V. I. Semenyaka, M. V. Yagodvik, E. V. Averianov, S. V. Burnayeva, A. V. Assa Metabolic intoxication effect on individual time perception index in patients with hemophilia	16
N. A. Bashlakova, D. V. Shubenok, Z. I. Kravchuk, S. P. Martsev, T. D. Tyabut Diagnostic significance of laboratory markers for antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus	18
S. A. Vasiliev, V. L. Vinogradov, E. B. Oriol, A. L. Berkovskiy, E. V. Sergeeva, A. V. Mazurov, Z. K. Karabudagova Hereditary microthrombocyte thrombocytopeny: diagnosis and treatment	20
E. P. Vashkevich, T. V. Shman Testing of CD107a marker expression for the assessment of antitumor activity of cytotoxic lymphocytes	22
E. V. Dzyuba Allogenic transplantation of hemopoietic stem cells in the treatment for chronic myeloleukemia	24
V. V. Dmitriyev, A. M. Kakunin, I. A. Dunayev, V. M. Zaharevich Recognition algorithm for systemic inflammatory response syndrome in febrile neutropenia in children with malignant neoplasms and hemoblastoses	26
V. V. Dmitriyev, I. A. Dunayev Acquired abnormalities in blood coagulation as a cause for hemorrhagic complications in the stages of program treatment of children with solid tumors and leukemia	28
E. V. Zuhovitskaya, O. P. Chaikovskaya, N. F. Vasilevskaya, Yu. N. Selilo Results of the application of imatinib (glivek) in the treatment of patients with chronic myeloleukemia	30
I. A. Iskrov, A. L. Uss, V. V. Smolnikova, D. G. Tsvirko, V. A. Zmachinsky Maintenance therapy of remission in patients with multiple myeloma	33
Z. K. Karabudagova, S. A. Vasiliev, V. L. Vinogradov, A. A. Kozlov, E. E. Yefremov, G. Yu. Belinin Autofibronektin-thrombocyte concentrate in the treatment for trophic skin lesions in patients with acute vascular purpura and atrophic arthritis	36
N. N. Klimkovich, T. I. Kozarezova, V. V. Smolnikova, L. V. Kolbasko, D. I. Suvorov, I. A. Iskrov Immunophenotype aberrance of marrow cells in primary myelodysplastic syndromes	37
T. I. Kozarezova, N. N. Klimkovich, V. I. Lagunovich-Cherepko, G. N. Rodionova, V. I. Smychek, V. V. Golikova Medical rehabilitation of children with myeloid neoplasms	40
E. L. Kozlova, N. N. Klimkovich Risk factors for the development of hemorrhagic syndrome in neonatal period	42
Yu. V. Kotlinskaya, K. V. Kotlinskiy, S. T. Akalovich, A. V. Vorobei, Yu. N. Orlovskiy, T. M. Doroshenko Soluble form of interleukin-8 CXCR2 receptor as a marker of the local inflammatory involvement of the human blood neutrophil leukocytes	45
K. V. Kotlinskiy, Yu. V. Kotlinskaya, N. N. Voitenok Stimulation of interleukin-8 synthesis in monocyte culture under soluble interleukin-8 CXCR2 receptor	48
S. I. Krivenko, A. L. Uss, N. I. Dedyulya Experience and prospects of the clinical application of mesenchymal stem cells	51
S. I. Krivenko, E. A. Nazarova, E. A. Selesniova, A. A. Koritko, N. I. Dedyulya, A. L. Uss, V. V. Smolnikova, E. S. Buzuk Transplant of mesenchymal stem cells from adipose tissue: obtainment, standartization and application	54

E. A. Kuzmich, V. A. Zmachinsky, N. F. Milanovich, N. A. Novosiolova Efficacy of the combined application of hemopoietic growth factors after stem hemopoietic cell transplatation	57
O. G. Luitarevich1, S. I. Krivenko1, M. V. Belevtsev Interleukin-6 as a prognostic factor in acute myeloblastic leukemia in adults	59
N. F. Milanovich Present-day approaches to the treatment for chronic lymphatic leukemia: application of rituximab in clinical practice.....	61
N. F. Milanovich, V. I. Levin, A. L. Uss, G. V. Semionov Finding a donor for stem cells depending on the distribution of HLA antigen system parameters in the patient population	64
L. V. Movchan, T. V. Shman Analysis of the number of cells with CD34+CD38- and CD34+CD38-CD19+ phenotypes as potential leukemic stem cells in acute lymphoblastic leukemia in children	66
O. M. Morozova Alemtuzumab in the treatment of patients with chronic lymphatic leukemia	69
I. A. Nikitina, A. I. Gritsuk Changes in thymocyte topology and indices of thymus energetic exchange at the earliest term after irradiation	71
Zh. V. Peshnyak, G. A. Shpak, L. A. Smirnova, V. V. Rachitskaya, A. L. Truhan, Yu. V. Ustinovich, E. M. Tumar, Z. I. Kravchuk Role of aquaporin-dependent membrane-transport mechanisms in the regulation of erythrocyte structural functional characteristics in anemias of various genesis	74
I. N. Prokopenko Myeloproliferation features in myelofibrosis with myeloid metaplasia in persons, affected by radiation after chernobyl disaster	76
I. P. Romashevskaya, N. N. Savva, N. P. Litvinko, O. V. Aleinikova Acute myeloblastic leukemia developing after the treatment for malignant neoplasm or aplastic anemia acquired in childhood.....	79
L. A. Smirnova, Z. I. Kravchuk, Zh. M. Kozich H- and L-ferritins in acute leukemia	81
A. Yu. Startseva, E. A. Yanushevskaya, A. L. Uss, S. I. Krivenko Practical aspects for donor selection for unrelated transplantation of hemopoietic stem cells	83
N. N. Tretyak, N. V. Goryainova, E. A. Kiseliova, A. I. Koval, M. Yu. Anoshina, O. V. Basova, A. M. Vakulchuk, T. P. Perehrestenko, V. N. Mnishenko FLAG protocol-based cure rate of acute myeloid leukemia.....	85
A. L. Uss, V. S. Kushnirenko, N. F. Milanovich State and prospects of the hematological service in the Republic of Belarus	87
E. A. Fedorovskaya, E. A. Melnik, N. K. Skachkova, A. P. Rybalskaya, L. N. Nemirovskaya Causative agents of infective inflammatory complications in patients with acute myeloid leukemia	90
S. O. Sharapova, A. S. Romantsova, A. V. Tarasova, T. A. Uglova, A. S. Pilipchik, M. V. Belevtsev, N. N. Savva Fanconi`s anemia in children: clinical description and variation spectrum in FANCA gene	92
S. O. Sharapova, A. A. Migas, T. A. Uglova, L. N. Byshniova, M. V. Belevtsev Genotype-phenotypic description of patients with Wiskott-Aldrich syndrome	95
V. M. Shmeliova, N. B. Saltykova, L. P. Papayan Hemostasis abnormalities in hyperhomocysteinemia.....	97
Zh. L. Suhih, M. V. Shtonda Therapy management of patients with iron deficiency anemia by a divisional therapist	100



*Гритта Янка Шауб,
профессор университетской клиники
(Эннедорф, Гамбург, Германия)*

IRON-REFRACTORY IRON DEFICIENCY ANEMIA (IRIDA)

Gritta E. Janka-Shaub M. D. Ph. D.

**University Hospital Hamburg,
Department of Pediatric Hematology and Oncology**

1981 Buchanan and Sheehan described 3 siblings with iron deficiency anemia who had adequate iron in their diet and did not have signs of chronic blood loss [1]. None of the children responded to oral iron therapy. Also intramuscular treatment with iron resulted in only a minor response of hemoglobin. Ferritin, however, increased, suggesting that iron stores were adequate but could not be used.

*Discovery of mutations in **TMPRSS6** as cause of inherited iron deficiency*

2008 Finberg et al. found mutations in the **TMPRSS6** gene in children from several families and called the disease iron-refractory iron deficiency anemia [2]. Up to now 40 patients have been described, including 5 own patients.

TMPRSS6 codes matriptase-2, a serine protease which belongs to the family of transmembrane serine proteases. Matriptase-2 is highly conserved in mammals and is a negative regulator for the expression of the peptide hormone hepcidin [3, 4]. Hepcidin is the key molecule involved in iron homeostasis. It is up regulated in iron overload and inflammation and down regulated in iron deficiency and hypoxia. Hepcidin binds to ferroportin, which is localized in the membrane of enterocytes, macrophages, and hepatocytes. This leads to internalization and degradation of ferroportin and consequently to decreased iron absorption and iron export [5].

Clinical picture

Anemia manifests itself usually in infancy or early childhood. Besides hypochromic, microcytic anemia with low reticulocytes there are no other abnormalities in the blood count. Growth and developmental milestones are normal. Table 1 shows values for red cell and iron parameters in our patients which are also representative for values described in the published cases.

Hemoglobin is usually between 7–9 g/dl; MCV around 50fl and MCH around 20 pg are compatible with severe iron deficiency. In contrast to expectations ferritin is often normal, but may also be slightly decreased. Serum iron is low, transferrin levels are normal or borderline increased or decreased. Very typical is a low transferrin saturation between 2–10 %.

Investigations for iron uptake show an inadequate increase in serum iron. All patients in whom hepcidin was measured, had values which were too high for the degree of anemia. Longitudinal follow-up of the patients show that anemia may be less pronounced in older patients.

Table 1 — Values for red cell and iron parameters*

	<mean ± SD	Pat 1, m	Pat 2, f	Pat 3, f	Pat 4a, m	Pat 4b, f
Age at presentation [years]	0,9 ± 0,4	0,5	0,6	0,8	1,4	1,4
Ethnic origin		Turkish	Turkish	Turkish	German	German
Hemoglobin [g/dl]	6,9 ± 0,8	6,1	7,8	7,5	6,9	6,1
MCV [fl]	52,6 ± 3,0	57	49	54	51	52
MCH [pg]	15,8 ± 0,8	16,8	15	15,2	16,5	15,6
Reticulocytes [%]	0,8 ± 0,2	1,2	0,7	0,7	0,6	0,7
Iron (normal: 6–28 μmol/l)	< 2	< 2	2,6	1,6	1,3	3,6
Ferritin (normal: 6–45 μg/l)	21 ± 15,8	42	8	5	18	32
Transferrin (normal: 2,4–3,6 g/l)	2,9 ± 0,6	2,2	2,7	3,5	3,7	2,5
Transferrin sat. (normal: 16–46 %)	3,4 ± 1,2	5	3	1,9	4	3
Hemoglobin [g/dl] at age of [years]		8,2 [14]	7,8 [18]	9,0 [9]	8,5 [12]	7,5 [9]

*Red cell and iron parameters in 5 patients from 4 families: m = male, f = female

Differential diagnosis

Besides iron deficiency, thalassemias have to be considered in patients with hypochromic, microcytic anemia, especially in patients with certain ethnic backgrounds. Organomegaly, increased reticulocytes, increased bilirubin and LDH should facilitate the differential diagnosis. Sideroblastic anemia is rare in childhood; ringed sideroblasts in the bone marrow are typical.

Iron deficiency in IRIDA closely resembles iron deficiency in states of inflammation; also in these conditions iron may not be available in spite of adequate stores.

Therapy

Oral iron supplementation is ineffective. Intravenous iron preparations which release ionic iron and quickly saturate transferrin may lead to partial correction of anemia [6]. In published cases 4 mg/kg once a week up to 3 mg/kg three times a week were able to increase hemoglobin.

Erythropoietin suppresses hepcidin production in healthy individuals [7]. This seems to be mediated directly via the bone marrow, since erythropoietin could only decrease hepcidin production in mice with a functional bone marrow. One of the patients published by Ramsay et al. who received erythropoietin with the aim to mobilize iron from the liver, had an increase in hemoglobin [8]. Unfortunately erythropoietin treatment did not increase hemoglobin in two of our patients.

Possible therapies for the future may be antibodies against hepcidin which already have been successfully used in mice [9].

REFERENCES

1. Buchanan, G. R. Malabsorption and defective utilization of iron in three siblings / G. R. Buchanan, R. G. Sheehan // J. Pediatr. — 1981. — Vol. 98(5). — P. 723–728.
2. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) / K. E. Finberg [et al.] // Nat. Genet. — 2008. — Vol. 40(5). — P. 569–571.
3. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis / A. R. Folgueras [et al.] // Blood. — 2008. — Vol. 112(6). — P. 2539–2545.
4. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency / X. Du [et al.] // Science. — 2008. — 320(5879). — P. 1088–1092.
5. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization / E. Nemeth [et al.] // Science. — 2004. — Vol. 306(5704). — P. 2090–2093.

Отформатировано: интервал
Перед: 12 пт, После: 6 пт,
Междустр.интервал: одинарный, Не
отрывать от следующего

Отформатировано: Шрифт: 10 пт

Отформатировано: Шрифт: 10 пт

Отформатировано: Шрифт: 10 пт

Отформатировано: Шрифт: 10 пт

6. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron / M. A. Melis [et al.] // *Haematologica*. — 2008. — Vol. 93(10). — P. 1473–1479.

7. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin / D. R. Ashby [et al.] // *Haematologica*. — 2010. — Vol. 95(3). — P. 505–508.

8. Matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia patients provide new insights into protease activation mechanisms / A. J. Ramsay [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 2009. — 18(19). — P. 3673–3683.

9. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia / B. J. Sasu [et al.] // *Blood*. — Vol. 115(17). — P. 3616–3624.

HEMOPHAGOCYTIC LYMPHOHISTIOCYTOSIS

Gritta E. Janka-Shaub M. D. Ph. D.

**University Hospital Hamburg,
Department of Pediatric Hematology and Oncology
Hamburg, Germany**

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a clinical syndrome, characterized by hyperinflammation and not a disease per se. It may have genetic causes or may be acquired under a variety of conditions. In infants and very young children HLH is predominantly due to immune defects with mutations in genes responsible for cytotoxic function of natural killer cells and cytotoxic T-lymphocytes; in older children, adolescents and adults HLH is encountered more often with infections, malignant diseases, autoinflammatory and autoimmune diseases, and acquired immune deficiency states.

Genetic (familial) HLH

The majority of pediatric cases are diagnosed within the 1st year of life. Cardinal symptoms of HLH are prolonged fever, hepatosplenomegaly and cytopenias [1]. Hemophagocytosis is initially absent in a substantial proportion of patients. Characteristic laboratory values in HLH include high ferritin, triglycerides, transaminases, bilirubin (mostly conjugated), sCD25 (α -chain of the soluble interleukin-2 receptor) and decreased fibrinogen. Impaired activity of natural killer (NK) cells is an important diagnostic marker in familial cases. About half of the children with HLH have a moderately increased cell count and/or protein content in the cerebrospinal fluid; about a 3rd show CNS symptoms such as seizures, meningitis-like symptoms, and cranial nerve palsies.

Genetic HLH can be divided into two subgroups [1]: 1st, the familial HLH (FHL), an autosomal recessive disease, and 2nd, the immune deficiency syndromes Chédiak-Higashi syndrome (CHS), Griscelli syndrome type 2 (GS-2), and x-linked proliferative syndrome (XLPS). In FHL the clinical syndrome of HLH is the primary and only manifestation. In CHS, GS-2 and XLPS the development of HLH is not mandatory, though frequent, and is often the initial manifestation of the disease.

In familial HLH four genetic defects have now been identified [2]. Perforin (FHL-2) is an essential component of the secretory granules of cytotoxic cells; together with granzymes it mediates apoptotic death of target cells. In addition it plays a critical role in maintaining immune homeostasis. Genes mutated in FHL-3, FHL-4 and FHL-5 are in-

volved in cytotoxic granule exocytosis. In Germany less than 10 % patients with FHL cannot be assigned to one of the four gene defects.

The immune deficiency syndromes GS-2 and CHS, characterized by albinism, neutrophil dysfunction and recurrent infections, are caused by mutations in genes also involved in cytotoxic granule trafficking or exocytosis. In XLPS [3] immune dysregulation is caused by mutations in other genes which are essential for the normal immune function of T-cells.

Acquired HLH

Acquired HLH can occur in all age groups. Viruses are the predominating organisms triggering HLH associated with infections. Herpes viruses, especially Epstein-Barr virus (EBV) are the leading trigger. Although viruses are primarily associated with HLH, protozoa, bacteria and fungi have also been implicated.

HLH as a severe complication of autoinflammatory/autoimmune diseases is commonly called macrophage activation syndrome (MAS) [4]. Most cases have been described in systemic-onset juvenile arthritis or adult-onset Still's disease. Patients with MAS may exhibit all of the characteristic features of HLH, including neurological symptoms. Current diagnostic criteria used for HLH are only fulfilled by part of the patients. The close relationship of MAS to other forms of HLH is supported by several lines of evidence, such as decreased NK-cell activity and perforin expression.

Acquired HLH in association with malignant diseases, especially malignant lymphoma and leukemia, is less common in children than in adults and may occur before, concomitantly or after the diagnosis of the malignancy. Most lymphomas associated with HLH are peripheral T/NK cell lymphomas. Several cases of HLH and anaplastic large cell lymphoma, also a T-cell malignancy, have been reported in children.

Pathophysiology

HLH is the result of an uncontrolled immune response triggered by different stimuli such as infectious organisms, tissue damage, metabolic products and others on the basis of an underlying inherited or acquired inability to cope adequately with this trigger.

Activated lymphocytes and macrophages secrete high levels of pro- and anti-inflammatory cytokines which lead to the cardinal clinical and laboratory findings. In immune competent individuals NK cells and cytotoxic T-cells (CTLs) kill infected cells and antigen presenting cells, which lead to removal of the antigen and termination of the immune response. When a killer cell encounters a target cell, a point of contact (immunological synapse) is formed. Cytotoxic granules, containing perforin, and granzymes substances, are carried towards the contact points, moving along microtubules, dock and fuse with the cell membrane and release their contents into the synapse [2]. All genetic defects in FHL and in GS-2 and CHS relate to granule-dependent cytotoxicity, either by interfering with granule trafficking, docking or exocytosis, or the formation of perforin.

Diagnostic criteria

In 1991 the HLH Study Group of the Histiocyte Society published the 1st diagnostic guidelines for HLH which were revised in 2007 [5]. A list of eight characteristic clinical and laboratory criteria has been defined and five of these criteria are required for the diag-

nosis of HLH. Impaired NK cell cytotoxicity is a characteristic finding in HLH and is included among the diagnostic criteria. More recently, flow cytometry has been used as a screening method to identify patients with genetic predisposition to HLH. Perforin expression, and SAP and XIAP expression to diagnose XLP-1 and XLP-2, can be measured in lymphocyte subsets by intracellular staining. Mutations in genes related to granule trafficking and exocytosis, but not in PFR1 lead to impaired translocation of CD107a (lysosomal associated membrane glycoprotein — LAMP-1) to the cell surface upon stimulation of cytotoxic cells.

Treatment

Untreated, FHL is a rapidly fatal disease. Most patients die from bacterial or fungal infections due to prolonged neutropenia, from multiorgan failure, or from cerebral dysfunction. There is also substantial mortality in acquired HLH, depending on the underlying disease.

The immediate aim in the treatment of any patient with HLH is to suppress the severe hyperinflammation that is responsible for the life-threatening symptoms. If a treatable organism can be identified, therapy against this pathogen should be employed. The 2nd aim is to interrupt the mutual activation of cytotoxic T-cells and macrophages, either by destroying infected macrophages or killing T-lymphocytes. In genetic HLH hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is indicated to replace the defective immune system by normally functioning cells.

Although prognosis has improved considerably applying these principles [6], there is the need for more effective treatment regimens and for reduction of transplant mortality.

REFERENCES

1. Janka, G. E. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis / G. E. Janka // *Eur. J. Pediatr.* — 2007. — Vol. 166. — P. 95–109.
2. De Saint Basile, G. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules / G. De Saint Basile, G. Ménasché, A. Fischer // *Nat. Rev. Immunol.* — 2010. — Vol. 11. — P. 568–579.
3. Pachlopnik Schmid, J. Clinical similarities and differences of patients with x-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency) / J. Pachlopnik Schmid // *Blood.* — 2011. — Vol. 117. — P. 1522–1529.
4. Grom, A. A. Macrophage activation syndrome: advances towards understanding pathogenesis / A. A. Grom, E. D. Mellins // *Curr. Opin. Rheumatol.* — 2010. — Vol. 22. — P. 561–566.
5. Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis / J. I. Henter [et al.] // *Pediatr. Blood Cancer.* — 2007. — Vol. 48. — P. 124–131.
6. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation / J. I. Henter [et al.] // *Blood.* — Vol. 100. — P. 2367–2373.

Дорогие коллеги!

Сердечно приветствую всех участников конференции «Актуальные вопросы гематологии»!

Каждый врач-практик и теоретик в своей деятельности широко сталкивается с проблемами клинической гематологии, которая как наука в настоящее время является нужной и важной в любой медицинской специальности. Кроме того, гематология — одна из самых высокотехнологичных отраслей медицины. На сегодняшний день, благодаря использованию программной полихимохимиотерапии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и своевременной адекватной сопроводительной терапии достигнуты значительные успехи в области лечения онкогематологических заболеваний. Настоящая конференция призвана обобщить мировой и собственный науч-

ный и практический опыт в диагностике и лечении гематологических заболеваний, а также обсудить возможности реабилитации пациентов данного профиля.

Дорогие друзья и коллеги! Разрешите пожелать Вам плодотворной работы. Уверен, что благодаря профессионализму, настойчивости и творческому подходу мы сможем решить самые сложные задачи.

С уважением,
ректор УО «Гомельский
государственный медицинский
университет», д. м. н., профессор

А. Н. Лызиков

**Уважаемые коллеги!**

От всей души поздравляю вас с открытием международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы гематологии». Сегодня гематология является одной из самых высокотехнологичных областей современной медицины. Большое количество пациентов, страдавших серьезными заболеваниями, возвращаются к нормальной, полноценной жизни благодаря ученым и врачам-гематологам. Уверена, что конференция предоставит возможность специалистам в области гематологии обсудить широкий круг профессиональных тем. А итогом их обсуждения и анализа станут конкретные, востребованные на практике рекомендации по развитию этой отрасли.

Желаю всем участникам и организаторам конференции здоровья, благополучия и успешной работы.

Директор ГУ «РНПЦ детской онкологии
и гематологии» д.м.н, профессор, чл.-корр.
НАН Беларуси

О. В. Алейникова



Мне доставляет огромное удовольствие поздравить врачей-гематологов страны с этой международной конференцией. Наша профессия — одна из самых почетных, требует высокого профессионализма и бескорыстной самоотдачи. Конференция призвана способствовать активизации научных исследований в области гематологии, внедрению передовых диагностических, лечебных и профилактических технологий в практическое здравоохранение. Я рада возможности встречи с Вами и надеюсь на честные, смелые дискуссии по обсуждаемым вопросам. Желаю Вам оптимизма, успешной плодотворной работы,

счастья, крепкого здоровья, радости от каждого дня и новых творческих успехов в нашем благородном труде.

ГУО «Белорусская медицинская академия
последипломного образования», профессор
кафедры детской онкологии и гематологии,
д. м. н., профессор

Т. И. Козарезова



Глубокоуважаемые коллеги!

Прогресс в любой области деятельности определяется в первую очередь научными достижениями. В полной мере это относится и к гематологической службе. Объединение усилий ученых и врачей-практиков обеспечило внедрение самых современных протоколов лечения онкогематологических заболеваний, разработку и внедрение высокоэффективных отечественных противоопухолевых лекарственных препаратов, активное применение трансплантации стволовых клеток.

В настоящее время перед гематологической службой нашей страны стоит задача перехода на новый уровень, который позволит удовлетворить возрастающие потребности здравоохранения в новых диагностических и лечебных технологиях. Совершенствование медицинской помощи гематологическим больным, в первую очередь больным гемофилией, а также разработка более эффективных методов диагностики и лечения лейкозов являются приоритетными задачами гематологической службы, определяющими позиции здравоохранения страны в мировом сообществе.

Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы гематологии» предоставляет хорошую возможность для специалистов из разных стран обменяться мнениями, обсудить сложные и нерешенные вопросы, согласовать дальнейшие направления исследований в рамках совместных программ. Я надеюсь, что работа конференции будет продуктивной и откроет новые возможности для сотрудничества в данной области медицины.

С уважением,
главный внештатный специалист по гематологии
Министерства здравоохранения Республики Беларусь,
д. м. н.

А. Л. Усс

УДК 616.115.33

**ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
НА ПОКАЗАТЕЛЬ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ВОСПРИЯТИЯ ВРЕМЕНИ
У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ****М. Ю. Аношина, П. В. Ющенко, В. И. Семеняка, М. В. Яговдик,
Е. В. Аверьянов, С. В. Бурнаева, А. В. Асса****Институт гематологии и трансфузиологии Национальной академии медицинских наук Украины,
г. Киев, Украина**

Представлены результаты исследования взаимосвязи между показателями метаболической интоксикации и индивидуального восприятия времени (индивидуальной минуты) у 112 больных гемофилией с кровоизлияниями различной локализации.

Установлено, что критериями, позволяющими оценить способность организма больного к адаптации, являются показатели перекисного окисления липидов и проницаемости эритроцитарных мембран. Маркером изменений метаболизма в организме больных гемофилией при кровоизлияниях может служить показатель индивидуального восприятия времени, что позволяет рассматривать его как дополнительный критерий оценки клинического течения и эффективности лечения.

Ключевые слова: гемофилия, индивидуальное восприятие времени, метаболическая интоксикация, проницаемость эритроцитарных мембран, перекисное окисление липидов, молекулы средней массы.

**METABOLIC INTOXICATION EFFECT ON INDIVIDUAL
TIME PERCEPTION INDEX IN PATIENTS WITH HEMOPHILIA****M. Yu. Anoshina, P. V. Yuschenko, V. I. Semenyaka, M. V. Yagodvik,
E. V. Averianov, S. V. Burnayeva, O. V. Assa****Institute of Haematology and Transfusiology National Academy of Medical Sciences of Ukraine,
Kiev, Ukraine**

The research results of the interrelation between the indices of metabolic intoxication and individual time perception (individual minute) in 112 patients with hemophilia with haemorrhages of various localization have been presented.

It has been ascertained, that the indices of lipid peroxidation and permeability of erythrocytic membranes are criteria that make it possible to assess the ability of an organism for adaption. The index of individual time perception may serve as a marker for metabolism changes in hemophilia patients' organism, which allow of considering it as an additional assessment criterion for the clinical course and cure rate.

Key words: hemophilia, individual time perception, metabolic intoxication, permeability of erythrocytic membranes, lipid peroxidation, intermediate mass molecules.

Введение

В настоящее время в развитых странах мира — США, Великобритании, Германии, Франции, России, Китае, Японии приоритетным направлением медицины является лечение больных с учетом влияния хронобиологических факторов (ХБФ). Установлено, что нарушение биологических ритмов, являющихся факторами адаптации организма к окружающей среде, предшествует и сопровождает развитие патологических состояний [2, 6, 8]. Одним из ХБФ, отображающих степень организации биологических ритмов человека, является индивидуальное восприятие времени, определяемое с помощью теста продолжительности индивидуальной минуты (ИМ) [4, 6]. Считается, что ИМ является критерием оценки адаптационных возможностей метаболических систем организма. Литературные данные и наши исследования 2000–2010 гг. показали, что у больных гемофилией па-

тологические изменения опорно-двигательного аппарата сопровождаются синдромом метаболической интоксикации (МИ).

Цель исследования

Исследование взаимосвязи между продолжительностью ИМ и показателями МИ у больных гемофилией при кровоизлияниях различной локализации.

Материалы и методы исследования

Было обследовано 112 больных гемофилией, находящихся на лечении в отделении хирургической гематологии и гемостазиологии ГУ «ИГТ НАМНУ». Средний возраст больных составлял $(32,9 \pm 1,8)$ года. В зависимости от показателя ИМ больных разделили на 3 группы. В 1-ю группу вошли пациенты ($n = 32$, 28,6 % от числа больных), адекватно оценивающие временной интервал, ИМ — $60,3 \pm 0,7$ с, во 2-ю группу ($n = 44$, 39,3 %) — лица, ускоряющие время, ИМ — $42,3 \pm 1,1$ с, в 3-ю ($n = 36$, 32,1 %)

— большие, замедляющие течение времени, ИМ — $78,2 \pm 1,3$ с. С целью исключения влияния суточных ритмов образцы крови для биохимических исследований всегда брали натощак утром с 8 до 10 ч. Исследования МИ включали определение проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) методом кривой мочевинового гемолиза [3], показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) модифицированным методом И. А. Волчегорского и соавт. [1] и молекул средней массы (МСМ) модифицированным методом Н. И. Габриэлян [5].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1. Установлено, что при кровоизлияниях различной локализации у больных гемофилией по сравнению с практически здоровыми лицами, достоверно нарушается проницаемость клеточных мембран. У больных отмечено комбинированное изменение кривой мочевинового гемолиза (ПА/В-тип ПЭМ согласно классификации [3]). Снижение показателей в ее верхней части указывает на уплотнении струк-

туры мембраны, вероятно, в результате изменений ее белковой и липидной составляющих, а повышение в нижней части кривой — на возможную активацию процессов ПОЛ. Действительно, в эритроцитах и плазме крови при перекисном окислении как нейтральных липидов, так и фосфолипидов значительно повышается уровень изолированных двойных связей (ИДС) — субстратов ПОЛ, диеновых (ДК), триеновых (ТК) и оксодиеновых (ОДК) конъюгатов и конечных продуктов ПОЛ типа шиффовых оснований (ШО), за исключением содержания последних при перекисидации нейтральных липидов в эритроцитах (оно снижается). Также установлено, что при кровоизлияниях у больных гемофилией достоверно повышается уровень биологически активных олигопептидов, вызывающих дискоординацию метаболических процессов в организме (показатели D_{238} , D_{254} , D_{280}), изменяется пептидно/нуклеотидный коэффициент — $K_{238/260}$, коэффициент ароматичности — $K_{238/280}$ и коэффициент распределения — $K_{280/254}$.

Таблица 1 — Показатели метаболической интоксикации у больных гемофилией в зависимости от индивидуального восприятия времени, $M \pm m$

Показатели		1-я группа	2-я группа	3-я группа	
Пероксидация нейтральных липидов, Е/мл	Эритроциты	ИДС	$1,319 \pm 0,147^*$	$1,932 \pm 0,120^{*1}$	$1,851 \pm 0,139^{*1}$
		ДК	$0,625 \pm 0,076^*$	$1,201 \pm 0,084^{*1}$	$1,143 \pm 0,098^{*1}$
		ТК	$0,211 \pm 0,022^*$	$0,325 \pm 0,023^{*1}$	$0,322 \pm 0,029^{*1}$
		ОДК	$0,187 \pm 0,021^*$	$0,321 \pm 0,022^{*1}$	$0,304 \pm 0,027^{*1}$
		ШО	$0,049 \pm 0,011$	$0,040 \pm 0,003^*$	$0,041 \pm 0,004^*$
	Плазма	ИДС	$2,977 \pm 0,109^*$	$3,369 \pm 0,108^{*1}$	$3,561 \pm 0,155^{*1}$
		ДК	$2,047 \pm 0,143^*$	$2,063 \pm 0,093^*$	$2,481 \pm 0,126^{*1,2}$
		ТК	$0,450 \pm 0,028^*$	$0,457 \pm 0,026^*$	$0,553 \pm 0,037^{*1,2}$
		ОДК	$0,438 \pm 0,024^*$	$0,463 \pm 0,023^*$	$0,545 \pm 0,034^{*1,2}$
		ШО	$0,195 \pm 0,020$	$0,176 \pm 0,009$	$0,277 \pm 0,065$
Пероксидация фосфолипидов, Е/мл	Эритроциты	ИДС	$1,363 \pm 0,075^*$	$1,813 \pm 0,076^1$	$1,764 \pm 0,103^1$
		ДК	$0,747 \pm 0,046$	$1,118 \pm 0,061^{*1}$	$1,067 \pm 0,096^{*1}$
		ТК	$0,614 \pm 0,048$	$0,669 \pm 0,030^*$	$0,595 \pm 0,025^{*2}$
		ОДК	$0,498 \pm 0,024$	$0,586 \pm 0,023^{*1}$	$0,539 \pm 0,023^*$
		ШО	$0,200 \pm 0,018^*$	$0,226 \pm 0,011^*$	$0,202 \pm 0,014^*$
	Плазма	ИДС	$4,428 \pm 0,223^*$	$5,400 \pm 0,169^{*1}$	$5,534 \pm 0,160^{*1}$
		ДК	$2,623 \pm 0,096^*$	$2,984 \pm 0,112^1$	$3,301 \pm 0,120^{1,2}$
		ТК	$1,454 \pm 0,034^*$	$1,633 \pm 0,070^1$	$1,655 \pm 0,057^1$
		ОДК	$1,848 \pm 0,049^*$	$1,980 \pm 0,073^*$	$2,149 \pm 0,065^{*1,2}$
		ШО	$0,275 \pm 0,093^*$	$0,105 \pm 0,007^{*1}$	$0,155 \pm 0,027^{*2}$
D_{238}		$0,191 \pm 0,022^*$	$0,196 \pm 0,016^*$	$0,207 \pm 0,014^*$	
D_{254}		$0,151 \pm 0,008^*$	$0,173 \pm 0,010^{*1}$	$0,170 \pm 0,007^{*1}$	
D_{260}		$0,178 \pm 0,008$	$0,204 \pm 0,010^1$	$0,199 \pm 0,007^1$	
D_{280}		$0,333 \pm 0,007^*$	$0,367 \pm 0,014^{*1}$	$0,381 \pm 0,009^{*1}$	
$K_{280/254}$		$2,282 \pm 0,077^*$	$2,225 \pm 0,058^*$	$2,173 \pm 0,087^*$	
$K_{238/260}$		$0,964 \pm 0,084^*$	$0,890 \pm 0,064^*$	$1,034 \pm 0,056^{*2}$	
$K_{238/280}$		$0,599 \pm 0,080^*$	$0,524 \pm 0,037^*$	$0,543 \pm 0,034^*$	
ПЭМ, в % гемолиза	1 (45:55)	$2,663 \pm 0,061^*$	$2,698 \pm 0,063^*$	$2,465 \pm 0,084^{1,2}$	
	2 (50:50)	$16,113 \pm 0,272^*$	$15,702 \pm 0,203^*$	$16,376 \pm 0,230^{*2}$	
	3 (55:45)	$51,686 \pm 1,676^*$	$50,449 \pm 0,278^*$	$45,728 \pm 0,822^{*1,2}$	
	4 (60:40)	$80,538 \pm 1,432^*$	$77,730 \pm 0,849^{*1}$	$79,259 \pm 0,863^*$	
	5 (65:35)	$93,059 \pm 0,752^*$	$91,642 \pm 0,324^1$	$93,188 \pm 0,581^{*2}$	

Примечание * Разница показателей по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ¹ разница показателей по сравнению с 1-й группой ($p < 0,05$); ² разница показателей по сравнению с 2-й группой ($p < 0,05$)

Выявленные достоверные межгрупповые отличия исследованных показателей и данных корреляционного анализа свидетельствуют о взаимосвязи ИМ с такими маркерами МИ как ПЭМ и ПОЛ. Установлена положительная корреляция с ПЭМ (показатели точек кривой мочевинового гемолиза при разных по объему соотношениях мочевины и хлорида натрия, %): у больных 1-й группы — с 1–3-й точками ($r = 0,355$; $p < 0,05$), ($r = 0,455$; $p < 0,01$), ($r = 0,358$; $p < 0,05$) соответственно. У пациентов 3-й группы — с 1 и 3-й точками кривой, связь отрицательная ($r = -0,406$; $p < 0,01$), ($r = -0,353$; $p < 0,05$) соответственно. У больных 2-й группы такой корреляционной связи не выявлено. Также не обнаружено корреляции с показателями МСМ у пациентов 2-й и 3-й групп, а у больных 1-й группы — связь слабая ($r = 0,375$; $p < 0,05$). Установлено межгрупповое отличие в корреляционных связях ИМ и ПОЛ. Для больных 1 группы выявлена корреляция — с продуктами перекисного окисления нейтральных липидов в эритроцитах: ДК ($r = 0,568$; $p < 0,001$), ТК ($r = 0,443$; $p < 0,01$), ОДК ($r = 0,668$; $p < 0,001$) и в плазме крови: ДК ($r = -0,601$; $p < 0,001$), ТК ($r = -0,452$; $p < 0,01$), ОДК ($r = -0,474$; $p < 0,01$), а также с ТК ($r = -0,355$; $p < 0,05$) — при пероксидации фосфолипидов в эритроцитах. Для пациентов 2-й группы — с ДК ($r = 0,371$; $p < 0,01$), ОДК ($r = 0,329$; $p < 0,05$) — при перекисном окислении фосфолипидов и ШО ($r = 0,374$; $p < 0,01$) — нейтральных липидов в эритроцитах, а для больных 3-й группы — только с ШО ($r = -0,336$; $p < 0,05$) — при пероксидации фосфолипидов в эритроцитах и ОДК ($r = -0,346$; $p < 0,05$) — в плазме крови. Также выявлены межгрупповые отличия при корреляции ИМ с индексом и степенью перекисного окисления ней-

тральных липидов и фосфолипидов, с коэффициентом их распределения в эритроцитах и плазме крови. Полученные данные свидетельствуют о том, что больные 1-й группы, адекватно оценивающие временной интервал, обладают более высокой способностью к адаптации.

Таким образом, результаты проведенных исследований у больных гемофилией свидетельствуют, что при кровоизлияниях различной локализации критериями, позволяющими оценить способность организма больного к адаптации, являются показатели ПОЛ и ПЭМ. Установлена взаимосвязь показателей ИМ и МИ. Маркером изменений метаболизма может служить показатель индивидуального восприятия времени, что позволяет рассматривать его как дополнительный критерий оценки клинического течения и эффективности лечения больных гемофилией с кровоизлияниями.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аношина, М. Ю. Оценка свободнорадикального окисления липидов в эритроцитах и плазме крови / М. Ю. Аношина, И. И. Лановенко // Физиологический журнал (укр.). — 1994. — № 40 (5–6). — С. 51–56.
2. Злыднева, М. А. Хронобиологические аспекты повышения эффективности терапии в клинике внутренних болезней: дис. ... канд. мед. наук (рукопись) / М. А. Злыднева. — Тула, 2006. — 171 с.
3. Колмаков, В. Н. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени / В. Н. Колмаков, В. Г. Радченко // Терапевтический архив. — 1982. — № 2. — С. 59–62.
4. Моисеева, Н. И. Временная среда и биологические ритмы / Н. И. Моисеева, В. М. Сысоев. — Л.: Наука, 2004. — 128 с.
5. Показатели эндогенной интоксикации у больных острой миелобластной лейкемией / М. Ю. Аношина [и др.] // Здоровье охранение Таджикистана. — 2009. — № 3. — С. 131–133.
6. Полищук, Н. А. К вопросу о сущности явления времени и эффективной хронотерапии хронических заболеваний / Н. А. Полищук // Врачебное дело. — 2008. — № 1–2. — С. 113–118.
7. Хильдебрандт, Г. Хронобиология и хрономедицина / Г. Хильдебрандт, М. Мозер, М. Лехвер. — М.: Арнебия, 2006. — 144 с.
8. Chronobiology in hematology and immunology / E. Haus [et al.] // Amer. J. Anatomy. — 2005. — Vol. 168, № 4. — P. 467–501.

УДК 616.5-002.525.5-07

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ МАРКЕРОВ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

Н. А. Башлакова¹, Д. В. Шубенок¹, З. И. Кравчук², С. П. Марцев², Т. Д. Тябут²

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

²Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск

Изучены уровни лабораторных маркеров антифосфолипидного синдрома — аутоантител к кардиолипину и β 2-гликопротеину 1 классов IgG и IgM — при системной красной волчанке. Установлено, что повышение уровней маркеров антифосфолипидного синдрома наблюдается в 67 % случаев заболевания системной красной волчанкой. При развитии вторичного антифосфолипидного синдрома чаще выявляются аутоантитела класса IgG.

Ключевые слова: системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, антитела к кардиолипину, антитела к β 2-гликопротеину 1.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF LABORATORY MARKERS FOR ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

N. A. Bashlakova¹, D. V. Shubenok¹, Z. I. Kravchuk², S. P. Martsev², T. D. Tyabut²

¹Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk

²Republican Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

The levels of the laboratory markers for antiphospholipid syndrome, i.e. cardiolipin autoantibodies and antibodies to β 2-glycoprotein 1 IgG and IgM in systemic lupus erythematosus have been studied. It has been established that the

increase of the marker level of antiphospholipid syndrome is observed in 67 % systemic lupus erythematosus cases. The IgG autoantibodies are more often detected in the development of secondary antiphospholipid syndrome.

Key words: systemic lupus erythematosus, antiphospholipid syndrome, cardiolipin antibodies, β 2-glycoprotein 1 antibodies.

Системная красная волчанка (СКВ) — хроническое, аутоиммунное заболевание соединительной ткани, неизвестной этиологии, характеризующееся наличием аутоантител и иммунных комплексов в крови. В основе патогенеза лежат нарушения иммунорегуляторных процессов, приводящих к гиперпродукции широкого спектра органонеспецифических аутоантител к различным компонентам ядра, что вызывает иммуновоспалительное повреждение тканей и нарушение функции внутренних органов.

СКВ является одним из наиболее тяжелых системных заболеваний соединительной ткани, чаще встречается в возрасте от 20 до 40 лет; около 90 % всех заболевших составляют женщины. За последние десятилетия отмечен рост частоты СКВ (достигая 250 случаев на 100 тыс. населения), что обусловлено улучшением диагностики и выявлением латентно протекающих форм. Для СКВ характерны многообразие клинических проявлений, вариантов течения и дебютов заболевания, а также вариабельность клинической симптоматики в период болезни, что нередко вызывает диагностические трудности [1]. Диагноз устанавливают на основании классификационных критериев Американской ревматологической ассоциации (АРА, 1997), включающих клиническую симптоматику, данные лабораторных и инструментальных методов исследования. Для верификации достоверного диагноза СКВ необходимо наличие 4-х и более из 11 критериев. В число лабораторных критериев включены антитела к двуспиральной ДНК, антиядерные антитела (выявляются у 95 % пациентов), антитела к Sm-антигену (высокоспецифичны, однако встречаются только у 10–30 % больных). У части больных выявляются криопреципитины, циркулирующие иммунные комплексы, а также ревматоидный фактор в невысоких титрах. Лабораторные маркеры антифосфолипидного синдрома (АФС) — антитела к кардиолипину и волчаночный антикоагулянт — обнаруживаются в 20–70 % случаев, однако их диагностическая значимость и корреляция с продолжительностью и активностью заболевания требует дальнейшего изучения. Диагностическая и прогностическая значимость антител к β 2-гликопротеину 1 — одному из лабораторных критериев АФС [2] при СКВ практически не изучена.

Цель

Изучение содержания иммунологических маркеров вторичных АФС-антител к кардиолипину и β 2-гликопротеину 1 при СКВ.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 40 здоровых лиц и 27 пациенток с достоверным диагнозом СКВ, находившихся на лечении в ревматологическом отделении УЗ «1-я городская клиническая больница» г. Минска с 2007 по 2009 гг. Средний возраст пациенток на момент обследования составлял 32,2 (24–40) года, средняя длительность заболевания — 8 (4–11) лет. Диагноз СКВ был выставлен согласно диагностическим критериям Американской ревматологической ассоциации (АРА, 1997 г.). Активность СКВ оценивали по клиническим проявлениям заболевания и данным лабораторных показателей активности (уровень антител к двухцепочечной ДНК (dsДНК), высокочувствительный С-реактивный белок (hs-СРБ, СОЭ). Диагноз вторичного антифосфолипидного синдрома выставляли на основании Сиднейских критериев [3]. Диагноз АФС считали достоверным при сочетании одного клинического с одним лабораторным критерием, выявленным в 2-х исследованиях, проведенных с интервалом в 12 недель.

Все пациенты получали медрол в средней дозе $10,03 \pm 3,2$ мг. Из них среднюю поддерживающую дозу глюкокортикостероидов (медрол $6,05 \pm 1,6$ мг) на протяжении 1 года получало 17 человек, у 10 человек осуществлялось медленное снижение подавляющей дозы медрола, назначенного по поводу высокой активности заболевания. В данной группе пациентов 21 человек дополнительно получал цитостатики (5 человек — азатиоприн в дозе 100 мг/сутки на протяжении 1 года, 18 человек — производные гидроксихлорохина — плаквенил в дозе 200 мг/сутки).

Для исследований уровней антител к кардиолипину классов IgG и IgM и β 2-гликопротеину 1-го класса IgG использовали диагностические наборы «ИФА-АНТИ-КАРДИОЛИПИН IgG/IgM» и «ИФА-АНТИ- β 2-гликопротеин 1», производства ГУ «РНПЦ гематологии и трансфузиологии». Антитела к β 2-гликопротеину 1-го класса IgM определяли с помощью лабораторной тест-системы, откалиброванной по контрольным образцам, содержащим IgG/IgM антитела к β 2-гликопротеину 1 в известных концентрациях (American Diagnostica, США, кат. № 649SGM).

Поскольку уровни АЧТВ у всех пациентов не превышали нормальных показателей и показателей контроля, волчаночный антикоагулянт не определяли.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программного обеспечения MS «Excel» (Microsoft, USA).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты определения антител к кардиолипину класса IgG и IgM и β 2-гликопротеину 1 класса IgG и IgM у здоровых людей ($n = 40$) соответствуют опубликованным в литературе данным [3–5].

Количество антител к кардиолипину класса IgG составило $3,52 \pm 0,22$ Ед/мл (от 1,75 до 9,10 Ед/мл), а антител класса IgM — $3,42 \pm 0,27$ Ед/мл (от 1,09 до 7,9 Ед/мл). Уровень антител класса IgG к β 2-гликопротеину 1 составил $3,87 \pm 0,24$ Ед/мл (от 1,76 до 7,31 ед/мл), а антител класса IgM — $1,93 \pm 0,12$ Ед/мл (от 0,71 до 3,19 Ед/мл).

В группе пациенток с СКВ ($n = 27$) повышенный уровень антифосфолипидных антител был обнаружен у 18 (67 %) человек. Чаще наблюдали повышение уровней аутоантител класса IgG: у 12 человек повышение уровня антител к кардиолипину и у 13 человек — к β 2-гликопротеину 1. Увеличение содержания антител класса IgM к кардиолипину было выявлено у 4-х пациентов, а к β 2-гликопротеину 1 — у 7 человек и сопровождалось повышением СОЭ и наличием АФС у половины пациентов. У 2-х пациенток обнаружен повышенный уровень всех 4-х видов аутоантител, что ассоциировалось с активностью СКВ.

Диагноз вторичного АФС был выставлен у 9 пациенток основной группы. Из клинических проявлений синдрома превалировал флеботромбоз — у 7 пациенток, у 2-х — рецидивирующий флеботромбоз и ТЭЛА мелких ветвей, у 1-й — асептический некроз головок бедренных костей, у 5 пациенток преобладали различные формы акушерской патологии (в виде неразвивающейся беременности — у 3-х человек, бесплодия — у 1-го человека, внутриутробная гибель плода — у 1-го человека). Повышенные уровни антифосфолипидных антител были выявлены у 8 пациенток с клиническими проявлениями тромбозов, у 1-й — уровни антифосфолипидных антител были в пределах нормы, однако пациентка постоянно принимала варфарин. Среди пациенток данной группы уровни антител к

кардиолипину и β 2-гликопротеину 1-го класса IgG были повышены у 7 человек, у 2-х человек были также повышены уровни антител класса IgM. У 1-го человека было выявлено повышение уровня антифосфолипидных антител только класса IgM — у пациентки развился с острый флеботромбоз, у 6 пациенток были выявлены лабораторные признаки активности СКВ (повышение СОЭ). Постоянную терапию непрямыми антикоагулянтами получало 7 пациенток, 2 — получали антиагреганты.

У пациенток, не имеющих клинических признаков тромбозов ($n = 18$), повышение уровней антифосфолипидных антител отмечалось у 10 (55 %) человек. Преимущественного образования аутоантител какого-либо субкласса или антигенной специфичности не обнаружено.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о диагностической значимости лабораторных маркеров антифосфолипидного синдрома при СКВ, поскольку повышенный уровень антител к кардиолипину и (или) β 2-гликопротеину 1 обнаруживается у 67 % пациенток с СКВ. Чаще выявляются антитела класса IgG.

Клинические проявления тромбозов различных локализаций чаще развиваются у пациенток с повышенным уровнем аутоантител к кардиолипину и β 2-гликопротеину 1 класса IgG.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Клюквина, Н. Г. Системная красная волчанка у мужчин / Н. Г. Клюквина, А. Е. Ильина // Русский медицинский журнал. — 2005. — № 8. — С. 513–518.
2. Антитела к β 2-гликопротеину 1 при системной красной волчанке: новый лабораторный маркер антифосфолипидного синдрома / Т. М. Решетняк [и др.] // Клиническая медицина. — 1998. — № 3. — С. 36–41.
3. Pathogenetic anti- β 2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change / B. de Laat [et al.] // Blood. — 2006. — Vol. 107, № 5. — P. 1916–1924.
4. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / S. Miyakis [et al.] // J Thromb Haemost. — 2006. — Vol. 4, № 2. — P. 295–306.
5. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of international workshop / W. A. Wilson [et al.] // Arthritis Rheum. — 1999. — Vol. 42. — P. 1309–1311.

УДК 616.155.294-07-08

**НАСЛЕДСТВЕННАЯ МИКРОТРОМБОЦИТАРНАЯ ТРОМБОЦИТОПАТИЯ:
ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ**

**С. А. Васильев, В. Л. Виноградов, Е. Б. Орел, А. Л. Берковский,
Е. В. Сергеева, А. В. Мазуров, З. К. Карабудагова**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации», г. Москва**

Исследована группа пациентов с наследственной микротромбоцитарной тромбоцитопатией. Определены диагностические критерии этой формы патологии тромбоцитов, показаны эффективные методы ее лечения.

Ключевые слова: тромбоциты, наследственные тромбоцитопатии, микротромбоцитарная тромбоцитопатия, геморрагический диатез, диагностика тромбоцитопатий, лечение тромбоцитопатий.

**HEREDITARY MICROTHROMBOCYTE THROMBOCYTOPATHY:
DIAGNOSIS AND TREATMENT****S. A. Vasiliev, V. L. Vinogradov, E. B. Oriol, A. L. Berkovskiy,
E. V. Sergeeva, A. V. Mazurov, Z. K. Karabudagova****Federal State Budget Institution Hematological Research Centre
Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow**

The group of patients with hereditary microthrombocyte thrombocytopathy has been studied. The diagnostic criteria for this form of thrombocyte pathology have been determined, the effective methods of the treatment have been shown.

Key words: thrombocytes, hereditary thrombocytopathy, microthrombocyte thrombocytopathy, hemorrhagic diathesis, diagnosis of thrombocytopathy, treatment for thrombocytopathy.

Введение

Наследственные тромбоцитопатии относятся к часто встречаемой патологии гемостаза человека [1, 2]. Несмотря на то, что отдельные формы наследственных тромбоцитопатий встречаются достаточно редко, в совокупности эти виды патологии составляют до 25–30 % от всех вариантов геморрагических коагулопатий [2, 3, 4]. По классификации С. А. Васильева, А. В. Мазурова (1997 г.) [5] наследственные тромбоцитопатии подразделяются на:

- мембранозные формы (патология мембранных рецепторов тромбоцитов);
- формы с патологией специфических гранул тромбоцитов (дефицит и аномалии α -гранул, δ -гранул, лизосом);
- формы с нарушением процесса активации тромбоцитов (дефицит циклооксигеназы, фосфолипазы и др.);
- смешанные или трудноклассифицируемые формы.

В 2001 г. нами впервые была описана форма патологии тромбоцитов — наследственная микротромбоцитарная тромбоцитопатия [6].

Цель исследования

Разработка схемы диагностики и оценка эффективности лечения геморрагического синдрома у пациентов с наследственной микротромбоцитарной тромбоцитопатией.

Материалы и методы исследования

Нами исследованы 6 пациентов (2 мальчика и 4 девочки в возрасте от 7 до 15 лет). Исследование гемостаза включало в себя: стандартизованные тесты (АЧТВ, протромбиновый индекс, тромбиновое время, фибриноген, XPa-зависимый фибринолиз); определение факторов VIII и IX, фактора Виллебранда; оценка агрегационной активности тромбоцитов с агонистами — АДФ, ристоцетином, коллагеном, адреналином, арахидоновой кислотой. У всех пациентов проводилось морфологическое исследование показателей крови (тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов) с обязательной морфометрией тромбоцитов при помощи световой микроскопии (оп-

ределялись размер тромбоцитов, содержание α -гранул; подсчитывалось количество D-форм тромбоцитов, C1 форм (сферы 1 — активированные тромбоциты), C2 формы (сферы 2 — ретикулотромбоциты, протромбоциты).

Результаты исследования

Обследование пациентов показало, что геморрагический синдром у них характеризовался преимущественно, петехиально-синячковым типом, особенно на местах давления (от ручек школьного портфеля, резинок носков и др.), отмечались повышенные меноррагии, редко — носовые кровотечения, необычная локализация кровотечения (ушная раковина, поры щек). Исследования коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза не выявило существенных отклонений от нормы; агрегация тромбоцитов с АДФ, ристоцетином, коллагеном, адреналином, арахидоновой кислотой была в пределах нормальных величин. Микроскопическая морфометрия тромбоцитов показала существенное снижение размеров тромбоцитов до 1 мкр. — 1,5 мкр., содержание α -гранул обычно носило умеренный или диффузный характер. На основании полученных данных исследования всем 6 пациентам был установлен диагноз: наследственная микротромбоцитарная тромбоцитопатия. При лечении геморрагического синдрома у пациентов с наследственной микротромбоцитарной тромбоцитопатией эффективными оказались: отвар крапивы; дицинон, аскорутин, транексам, эмосинт. Ни в одном случае не пришлось прибегать к трансфузиям концентратов тромбоцитов. Наблюдение за пациентами в течение 5–8 лет показало, что у 2-х больных со временем размер тромбоцитов в крови стал нормальным и составил 2 мкр. — 2,5 мкр. У остальных больных существенное преобладание микротромбоцитов в крови остается до настоящего времени с сохранением небольших признаков геморрагического диатеза.

Заключение

Таким образом, диагноз наследственной микротромбоцитарной тромбоцитопатии устанавливается на основании выявления существенного

преобладания микроформ тромбоцитов в мазке периферической крови (размер тромбоцитов 1 мкр. — 1,5 мкр.). Для купирования геморрагического синдрома эффективны терапевтические средства, улучшающие тромбоцитарно-сосудистый гемостаз. В классификации наследственных тромбоцитопатий мы отнесли наследственную микро-тромбоцитарную тромбоцитопатию к смешанным или трудноклассифицируемым формам.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Тромбоцитопении: патогенез, дифференциальная диагностика и основы терапии / С. А. Васильев [и др.] // Тромбоз, Гемостаз и Реология, 2000. — № 4. — С. 5–15.
2. Пособие по изучению адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов / А. Л. Берковский [и др.] / НПО Ренам. — М., 1999. — 29 с.
3. Васильев, С. А. Наследственные дефекты мембранных гликопротеинов тромбоцитов / С. А. Васильев, Л. В. Жердева, А. В. Мазуров // Гематология и трансфузиология. — 1994. — № 1. — С. 34–39.
4. Мазуров, А. В. Структура и функции мембранных гликопротеинов тромбоцитов / А. В. Мазуров, С. А. Васильев // Гематология и трансфузиология. — 1994. — № 1. — С. 29–34.
5. Васильев, С. А. Классификация, основы диагностики и терапии наследственных тромбоцитопатий / С. А. Васильев, А. В. Мазуров // Проблемы гематологии и переливания крови. — 1997. — № 3. — С. 29–38.
6. Наследственная микро-тромбоцитарная тромбоцитопатия / С. А. Васильев [и др.] // Атеротромбоз и артериальная гипертензия: VI Нац. конф., Москва, 21–23 мая 2001 г. — 2001. — С. 78–79 (прил. Тромбоз, гемостаз и реология).

УДК 616.155.32-07

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА CD107A ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ

Е. П. Вашкевич, Т. В. Шман

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, г. Минск

Оценка противоопухолевой активности цитотоксических клеток является важным показателем их функционального статуса при проведении клеточной иммунотерапии. В последнее время для этих целей широко используется определение экспрессии маркера CD107a методом проточной цитофлуориметрии.

Проведенные нами исследования по определению противоопухолевой активности мононуклеарных клеток периферической крови (МНК), в т. ч. стимулированных интерлейкином-2, показали, что инкубация МНК в присутствии опухолевой линии К-562 способствовала достоверному повышению процента естественных киллерных (ЕК) и ЕК-подобных Т-клеток, экспрессирующих CD107a. Также была выявлена прямая корреляция между процентом CD107a+ ЕК-клеток в присутствии К-562 и количеством погибших мишеней в тесте с использованием окраски флуоресцентной метки CFSE.

Метод оценки экспрессии CD107a позволяет измерять цитотоксическую активность на уровне клетки в конкретной популяции эффекторных клеток и может использоваться наряду со стандартными методами определения лизиса клеток-мишеней.

Ключевые слова: мононуклеарные клетки, цитотоксичность, проточная цитофлуориметрия, естественные киллеры.

TESTING OF CD107A MARKER EXPRESSION FOR THE ASSESSMENT OF ANTITUMOR ACTIVITY OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTES

E. P. Vashkevich, T. V. Shman

Republican Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

The assessment of antitumor activity of cytotoxic lymphocytes is an important indicator of their functional status in cellular immunotherapy. Testing of CD107a marker expression by the method of flow cytofluorimetry has been widely lately used for these purposes.

The research that we carried out to determine the antitumor activity of mononuclear lymphocytes in peripheral blood including those stimulated by interleukine-2 showed that incubation of mononuclear lymphocytes in peripheral blood in the presence of K-562 tumor line was conducive to the reliable increase in rates of natural killer and killer-like cells expressing CD107a. A straight correlation between CD107a+killer cells percentage and the number of the dead targets in the test with the use of CFSE fluorescent label was detected.

The assessment method of CD107a expression makes it possible to measure the cytotoxic activity in a cell in a concrete population of effector cells and may be used alongside with standard methods for target-cell lysis.

Key words: mononuclear cells, cytotoxicity, flow cytofluorimetry, natural killers.

Введение

Определение цитотоксической активности (ЕК) и Т-клеток проводится при исследованиях иммунологического статуса пациентов с раз-

личными гематологическими и другими заболеваниями, для оценки качества клеточного продукта при проведении иммунотерапии цитотоксическими клетками, для оценки иммунного от-

вета пациентов в процессе противоопухолевой вакцинотерапии и др.

Наиболее распространенным цитотоксическим тестом является определение радиоактивных изотопов (^{51}Cr), высвободившихся из лизированных эффекторами клеток-мишеней [2, 7, 8]. В последнее время все чаще используют нерадиоактивные флуоресцентные красители (PKH-26, CFSE) для окрашивания мишеней с последующей оценкой их жизнеспособности с помощью проточной цитофлуориметрии [4, 5]. Использование этих методов позволяет оценить количество погибших мишеней, однако не дает информации о количестве и фенотипе активных клеток-эффекторов.

CD107a (LAMP-1 — lysosomal associated membrane glycoprotein) является белком мембраны литических гранул, содержащих гранзим и перфорин. При активации цитотоксических клеток происходит высвобождение содержимого таких гранул (дегрануляция) и в этот момент CD107a обнаруживается на поверхности клетки [1, 3].

Цель исследования

Определить противоопухолевую активность цитотоксических клеток по экспрессии CD107a и сравнить с результатами, полученными в стандартном цитотоксическом тесте.

Материалы и методы исследования

Функциональную активность цитотоксических клеток оценивали 2 способами. Первый — по количеству погибших клеток-мишеней, второй — экспрессии CD107a на клетках-эффекторах.

В качестве мишеней использовали клетки опухолевой линии K562, эффекторов — МНК, полученные от 14 здоровых доноров.

Для активации цитотоксических клеток выделенные на градиенте плотности МНК культивировали при 5 % CO_2 , 95 % влажности и 37 °C в полной среде IMDM в концентрации $1 \times 10^6/\text{мл}$ в присутствии интерлейкина ИЛ-2 (1000 МЕ/мл, препарат «Фонколейкин», «Биотех», Россия) и без него (контроль).

Через 3-е суток культивирования определяли противоопухолевую активность МНК методом проточной цитофлуориметрии в следующих тестах:

1. Клетки линии K-562 отмывали в культуральной среде и окрашивали carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (10 мкг/мл, 20 мин). Затем клетки отмывали в среде, содержащей сыворотку, и смешивали с эффекторными клетками (МНК доноров) в соотношении эффектор:мишень — 5:1. Цитотоксический тест проводили в течение 4-х часов. По окончании реакции в клеточную взвесь добавляли пропидиум иодид, по окрашиванию которого определяли количество погибших мишеней. Специфический лизис вычисляли по формуле, учитывающей процент лизированных клеток-мишеней, инкубированных в присутствии клеток-эффекторов, и спонтанный лизис таких клеток [6].

2. При смешивании эффекторов с мишенями в соотношении 5:1 в культуру добавляли моноклональные антитела (мАТ) к CD107a-PE («Becton Dickinson», США) или изотипический контроль. После 1 ч инкубации добавляли мөненин («Sigma-Aldrich», США). По окончании всего процесса культивирования (4 ч) клетки окрашивали мАТ к CD3-FITC, CD56-PC-5 («Becton Dickinson», США; «Beckman Coulter», США). После клетки дважды отмывали в ФСБ и анализировали количество CD107a позитивных клеток среди ЕК-клеток (CD3-CD56+), Т-клеток (CD3+CD56-) и ЕК-подобных Т-клеток (CD3+CD56+).

Статистическую обработку данных проводили с применением непараметрических методов в программе «Statistica» 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что стимуляция МНК в присутствии ИЛ-2 приводила к достоверному увеличению экспрессии CD107a на клетках всех исследуемых популяций лимфоцитов (рисунок 1). Инкубация МНК в присутствии опухолевой линии K-562 также способствовала повышению процента CD107a+ ЕК и ЕКТ-клеток среди мононуклеаров, культивированных с или без ИЛ-2. Процент CD107a+ Т-клеток достоверно повышался в присутствии K-562 только в образцах МНК, стимулированных ИЛ-2. Необходимо отметить, что ЕК-клетки в большей степени по сравнению с Т- и ЕКТ-клетками активировались в присутствии линии K-562, что было заметно по количеству естественных киллеров, экспрессирующих маркер CD107a.

При оценке цитотоксичности в тесте с CFSE выявили увеличение количества погибших клеток K-562 в присутствии МНК, инкубированных с цитокином ($P < 0,01$, $n = 10$). Так, количество погибших клеток-мишеней в контроле составило $4,5 \pm 1,2$, тогда как в присутствии ИЛ-2 — $12,3 \pm 1,8$.

Также была выявлена прямая корреляция между процентом CD107a+ ЕК клеток в присутствии K-562 и количеством погибших мишеней в цитотоксическом тесте ($R=0,64$ и $R = 0,68$ для контрольных и стимулированных ИЛ-2 образцов, соответственно, $P < 0,05$, $n = 10$). При этом подобной зависимости для Т- и ЕКТ-клеток показано не было.

Таким образом, результаты определения противоопухолевой активности цитотоксических клеток по экспрессии маркера CD107a коррелируют с данными, полученными в тесте с лизисом клеток-мишеней. При этом метод определения экспрессии CD107a позволяет измерять цитотоксическую активность на уровне клетки в конкретной популяции эффекторов и может быть использован самостоятельно либо в комбинации с другими методами.

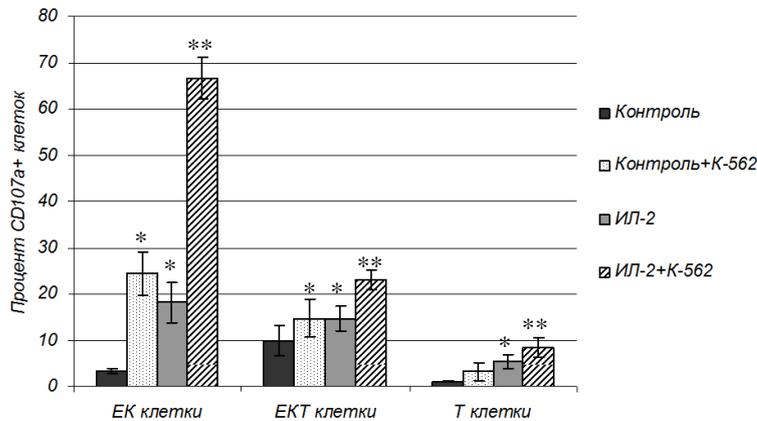


Рисунок 1 — Экспрессия CD107a на цитотоксических клетках, культивированных с или без ИЛ-2, в присутствии опухолевой линии К-562

Примечание: * $P < 0,05$ по отношению к контролю, ** $P < 0,05$ по отношению к ИЛ-2, $n = 14$.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T-cells by a flow cytometric assay for degranulation / M. R. Betts [et al.] // *J. of Immunol. Methods.* — 2003. — Vol. 281. — P. 65–78.
2. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labeled allogeneic target cells in vitro: inhibition by isoantibody and by drugs / K. T. Brunner [et al.] // *Immunology.* — 1968. — Vol. 14. — P. 181–196.
3. A novel flow cytometric assay for evaluating cell-mediated cytotoxicity / M. W. Burkett [et al.] // *J. Immunother.* — 2005. — Vol. 28, № 4. — P. 396–402.
4. Fisher, K. The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity / K. Fisher, A. Mackensen // *Methods.* — 2003. — Vol. 31. — P. 135–142.
5. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T-cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous

target cell population / I. Jedema [et al.] // *Blood.* — 2004. — Vol. 103, № 7. — P. 2677–2682.

6. Cytokine-induced killer cells against autologous CLL: direct cytotoxic effects and induction of immune accessory molecules by interferon- γ / M. Kornacker [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2006. — Vol. 119. — P. 1377–1382.

7. Morris, D. G. Studies of lymphokine-activated killer (LAK) cells. I. Evidence using novel monoclonal antibodies that most human LAK precursor cells share a common surface marker / D. G. Morris, H. F. Pross // *J. Exp. Med.* — 1989. — Vol. 169. — P. 717–736.

8. Ex-vivo expanded human NK-cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity / C. J. Voskens [et al.] // *J. of Exp. Clin. Cancer Res.* — 2010. — Vol. 29. — P. 134–146.

УДК 616.155.392+615.324

АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Е. В. Дзюба

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В статье приведены собственные данные лечения хронического миелолейкоза с применением аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является высокоэффективным методом лечения больных хроническим миелолейкозом.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

ALLOGENIC TRANSPLANTATION OF HEMOPOIETIC STEM CELLS IN THE TREATMENT FOR CHRONIC MYELOLEUKEMIA

E. V. Dzyuba

Municipal Clinical Hospital No. 9, Minsk

The article presents the data on the treatment for chronic myeloleukemia with the application of allogenic transplantation of hemopoietic stem cells. The analysis of the received results testifies to the fact that the allogenic transplantation of hemopoietic stem cells is a highly effective method of the treatment of patients with chronic myeloleukemia.

Key words: chronic myeloleukemia, allogenic transplantation of hemopoietic stem cells.

Введение

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) относится к опухолевым заболеваниям кроветворной системы и характеризуется прогрессирующей спленомегалией, лейкоцитозом, анемией, гиперклеточностью костного мозга и характерной цитогенетической аномалией. На его долю приходится около 20 % от всех лейкозов. Заболеваемость ХМЛ составляет 1–1,5 случая на 100 тыс. населения в год. Более 50 % пациентов заболевают в наиболее профессионально и социально активном возрасте — 30–50 лет. В настоящее время ХМЛ — одна из наиболее изученных форм лейкоза. Специфическим цитогенетическим маркером болезни является Филадельфийская (Ph¹) хромосома, которая возникает вследствие реципрокной транслокации между 9 и 22-й хромосомами.

Долгие годы единственным методом, способным вылечить больных ХМЛ, являлась аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) и диагноз ХМЛ был основным показанием для проведения аллоТГСК. Анализ результатов аллоТГСК от близкородственных доноров показывает, что вероятностная свободная от болезни выживаемость составляет 45–75 % в хронической фазе (ХФ) ХМЛ и 15–40 % в фазах акселерации (ФА) или бластного криза (БК) [2, 4]. С внедрением в клиническую практику в начале XXI в. ингибиторов тирозинкиназы, количество проводимых аллоТГСК при ХМЛ резко сократилось. К 2005 г. ХМЛ занимал уже 8-е место среди показаний для аллоТГСК. Однако, в последние годы, стала наблюдаться тенденция к росту числа трансплантаций, что связано с формированием у ряда пациентов резистентности к ингибиторам тирозинкиназы за счет генных мутаций [1, 3]. В 2010 г. Европейским обществом по борьбе с лейкемией (ELN) были определены показания к проведению аллоТГСК при ХМЛ: 1) стадия ФА или БК на момент постановки диагноза; 2) при прогрессировании заболевания на фоне терапии иматинибом; 3) при наличии мутации T3151; 4) при неудаче лечения ингибиторами тирозинкиназы II поколения.

В данной статье мы представляем результаты лечения больных ХМЛ с использованием аллоТГСК от HLA-идентичных близкородственных доноров.

Материалы и методы исследования

В исследование включено 60 пациентов (31 мужчина и 29 женщин), страдающих ХМЛ, которым была проведена аллоТГСК от HLA-идентичного близкородственного донора в отделении трансплантации костного мозга УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска в период с 01.01.1994 по 30.10.2009 гг. Медиана возраста составила 36 лет (17–55). Медиана времени от

момента установления диагноза до проведения аллоТГСК составила 11 мес. (2–52). Распределение пациентов в зависимости от фазы заболевания на момент проведения аллоТГСК: в ХФ заболевания находились 49 пациентов, в ФА и БК 9 и 2 пациента соответственно. Источником гемопоэтических клеток у 56 (93 %) больных был костный мозг, у 4-х (7 %) — мобилизованная периферическая кровь. У 56 пациентов в качестве протокола кондиционирования перед аллоТГСК использовалась комбинация миелосана и циклофосфамида (ВуСу), у 4-х пациентов — комбинация миелосана, циклофосфамида и этопозида (ВуСуVP) в стандартных миелоаблативных дозах. Трансфузию клеточной взвеси проводили в день 0 в периферическую вену со скоростью 500 мл/ч. Профилактику реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) проводили по стандартному протоколу с использованием циклоспорина и метотрексата.

Результаты исследования

Восстановление гемопоэза после аллоТГСК зарегистрировано у 58 (96,6 %) из 60 пациентов, двое больных умерли на +16 и +23 дни от токсических осложнений без признаков приживления донорского костного мозга.

100-дневная летальность составила 15 % (9 пациентов), 4 из них подверглись трансплантации в стадиях ФА или БК.

Причинами ранней посттрансплантационной летальности явились: острая РТПХ (4 больных); прогрессия заболевания с исходом в БК (1 больной); септический шок (1 больной); внутричерепное кровоизлияние (1 больной); и токсические осложнения (2 больных).

У всех 49 пациентов, выживших в первые 100 дней после аллоТГСК, была констатирована полная цитогенетическая и молекулярно-биологическая ремиссия. Период наблюдения этих больных составил от 1 до 190 мес. (медиана 43 мес.). Из них в последующем умерли 9 пациентов. Причинами поздней посттрансплантационной летальности явились: хроническая РТПХ (3 больных), рецидив ХМЛ (3 больных), печеночная недостаточность, как исход хронического активного гепатита С (1 больной), вторичная злокачественная опухоль (1 больной); инфекционные осложнения на фоне отторжения трансплантата (1 больной). Общая 5-летняя выживаемость составила 59 %, 5-летняя бессобытийная выживаемость — 42 %.

Долгосрочная (15 лет) вероятностная общая выживаемость составила 56 %. Долгосрочная выживаемость в зависимости от стадии заболевания составила в группе ХФ — 77 %, ФА — 34 %, БК — 0 %.

Дополнительно необходимо отметить, что 75 % больных, перенесших аллоТГСК, вернулись к трудовой деятельности.

Выводы

Долгосрочная выживаемость больных ХМЛ, перенесших аллоТГСК, свидетельствует в пользу высокой эффективности данного метода лечения. Расчетная 15-летняя общая выживаемость больных после аллоТГСК составила 56 %.

Успех аллоТГСК во многом зависит от стадии заболевания на момент трансплантации. Наилучшие результаты достигнуты при проведении трансплантации больным ХМЛ в хронической фазе.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Maziarz, R T.* Who to transplant with CML in the era of tyrosine kinase inhibitors? / R T. Maziarz // *Curr. Opin. Hematol.* — 2008. — Vol. 15(2). — P. 127–133.
2. *Goldman, J. M.* Long term outcome after allogeneic stem-cell transplantation for CML / J. M. Goldman // *Hematol J.* — 2004. — Vol. 5. — P. 98.
3. *Goldman, J. M.* How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era / J. M. Goldman // *Blood.* — 2007. — 110(8). — P. 2828–2837.
4. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results — an analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) / A. Gratwohl [et al.] // *Haematologica.* — 2006. — Vol. 91. — P. 513–521.

УДК 616.155.394.5-006.6

АЛГОРИТМ РАСПОЗНАВАНИЯ СИНДРОМА СИСТЕМОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ФЕБРИЛЬНОЙ НЕЙТРОПЕНИИ У ДЕТЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ И ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

В. В. Дмитриев, А. М. Какунин, И. А. Дунаев, В. М. Захаревич

**Республиканский научно-практический центр
детской онкологии и гематологии, г. Минск**

Чувствительность прокальцитонина (ПКТ) в качестве диагностического теста для выявления синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), равная 68 %, была ниже, чем у Ц-реактивного протеина ($\chi^2 = 6,2$; $p = 0,01$). Специфичность ПКТ 89 % была выше ($\chi^2 = 4,9$; $p = 0,025$), чем специфичность Ц-реактивного протеина (ЦРП), равная 76 %. Диагностическая значимость обоих тестов в плане выявления или распознавания ССВО существенно не отличалась, на что указывала площадь под кривой (area under curve, AUC) для ЦРП — 0,84 и ПКТ — 0,84. Параллельное определение ЦРП и ПКТ у пациентов с признаками фебрильной нейтропении позволило с вероятностью 78 % выявить пациентов, способных в течение 24–48 ч развить клинику ССВО на бактерию, и с вероятностью 56 % выявить пациентов, у которых в течение 24–48 ч не было клиники ССВО.

Ключевые слова: фебрильная нейтропения, синдром системного воспалительного ответа, прокальцитонин, Ц-реактивный протеин.

RECOGNITION ALGORITHM FOR SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME IN FEBRILE NEUTROPENIA IN CHILDREN WITH MALIGNANT NEOPLASMS AND HEMOBLASTOSES

V. V. Dmitriyev, A. M. Kakunin, I. A. Dunayev, V. M. Zaharevich

Republican Research Centre for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

The sensitivity of procalcitonin (PCT) as a diagnostic test of 68 per cent to detect systemic inflammatory response syndrome (SIRS) was lower than that of C-reactive protein (CRP) ($\chi^2 = 6,2$; $p = 0,01$). The specificity of both tests to detect and identify SIRS did not substantially differ, which was indicated by the area under curve for CRP — 0,84 and PCT — 0,84. The parallel detection of CRP and PCT in patients with the signs of febrile neutropenia made it possible to identify the patients, who were able to develop the clinic of SIRS within 24–48 hours with probability of 78 per cent and to identify the patients, who did not develop the SIRS clinic within 24–48 hours with probability of 56 per cent.

Key words: febrile neutropenia, systemic inflammatory response syndrome, procalcitonin, C-reactive protein.

Фактором риска развития септических осложнений у больных с онко-гематологическими заболеваниями авторы [1] рассматривают глубину и продолжительность нейтропении. Нейтропения менее 500 клеток/мм³ ($0,5 \times 10^9$ /л) в течение 7–10 дней и более указывает на тяжелый и продолжительный агранулоцитоз, что делает данное сочетание признаков основным фактором риска развития первичной инфекции, ее рецидивов или вторичной инфекции, несмотря на проводимую антибактериальную терапию. Ряд авторов

рассматривают повышение температуры тела до 38 °С и выше в состоянии нейтропении как фебрильную нейтропению и считают данный признак в качестве основного фактора прогноза развития септических осложнений [2].

Для дифференциальной диагностики между локальными изменениями и системной воспалительной реакцией на предполагаемую инфекцию многие исследователи используют повышение в крови на 2 стандартных отклонения, по сравнению с нормой, содержания ЦРП или ПКТ [3]. Ди-

агностический порог для ЦРП, по достижении которого у пациентов с гемобластомами фебрильную нейтропению расценивают как проявление сепсиса, не определен. По мнению ряда авторов, значения концентрации прокальцитонина, превышающие 0,5 нг/мл, рассматривают как патологические, подтверждающие подозрение на септический синдром. Значения ПКТ в диапазоне 0,5–2,0 нг/мл находятся в зоне неопределенности, в которой для констатации сепсиса необходимо микробиологическое подтверждение бактериемии [4]. Повышение уровня ПКТ свыше 2,0 нг/мл у лихорадящего пациента большинство исследователей однозначно связывают с сепсисом.

Цель исследования

Разработать алгоритм распознавания ССВО при фебрильной нейтропении у детей со злокачественными новообразованиями и гемобластомами.

Материал и методы исследования

Обследовано 170 пациентов в возрасте от 1 до 17 лет (медиана — 7 лет), находившихся на лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии» с 2008 по 2010 гг. со злокачественными новообразованиями и гемобластомами. Обязательный критерий включения в исследование для всех пациентов — уровень лейкоцитов периферической крови — $0,5 \times 10^9/\text{л}$ и менее. Календарной датой включения в исследование был день регистрации повышения аксиллярной температуры тела до 38°C в течение суток дважды, или однократного подъема до $38,5^\circ\text{C}$. Из числа обследованных пациентов в состоянии фебрильной нейтропении выделено две подгруппы: обучающая выборка — 122 ребенка и экзаменационная выборка — 48 детей.

Среди 76 пациентов обучающей выборки с клиникой ССВО — 68 больных нуждались в кардиотонической поддержке и применении вазопрессоров путем назначения дофамина и норадреналина, у 52 больных на день включения в исследование из крови была выделена различная, преимущественно грамотрицательная, микрофлора. У 46 пациентов обучающей выборки без клинических проявлений ССВО состояние было расценено как компенсированное, не требовавшее мероприятий интенсивной терапии и не представлявшее угрозы для жизни; результаты бактериологического исследования крови у всех отрицательны.

Для каждого из 48 пациентов экзаменационной выборки на день включения в исследование (фебрильная лихорадка в состоянии нейтропении) в соответствии с методикой, разработанной нами на основании анализа данных обучающей выборки, было сформулировано решение о возможности развития ССВО в течение ближайших суток. Через сутки после включения в исследование была произведена оценка

состояния и констатировано наличие или отсутствие клиники ССВО. В зависимости от наличия или отсутствия клиники ССВО через сутки после включения в исследование выделено две подгруппы: 1-я подгруппа — 32 пациента, у которых в течение ближайших 24 часов ухудшение состояния было расценено как системный воспалительный ответ, 2-я подгруппа — 16 детей без клинических признаков ССВО.

Результаты исследования

Среди пациентов обучающей выборки выявлена тесная взаимосвязь ($\chi^2 = 41$; $p = 0,00001$) между фактом выделения из крови бактериального (либо грибкового) возбудителя и регистрацией клиники системного воспалительного ответа, что позволяет говорить о развитии системного воспалительного ответа на бактериемии (либо фунгемию). Суть решения задачи по распознаванию системного воспалительного ответа на бактериемии была сведена к построению характеристической кривой (receiver-operator characteristic curve, ROC-curve) с расчетом точки перехода для определения оптимальной чувствительности, специфичности и диагностического порога для уровня ЦРП и ПКТ. Для ЦРП на основании расчета точки перехода диагностический порог составил $6,4 \times 10^{-2}$ г/л с уровнем специфичности 76 % и показателем чувствительности 84 %. Точка разделения между отсутствием и наличием клиники ССВО на бактериемии определила оптимальный порог для ПКТ, равный $0,86 \times 10^{-8}$ г/л. Чувствительность ПКТ в качестве диагностического теста для выявления ССВО, равная 68 %, была ниже, чем у ЦРП ($\chi^2 = 6,2$; $p = 0,01$). Специфичность ПКТ 89 % была выше ($\chi^2 = 4,9$; $p = 0,025$), чем специфичность ЦРП, равная 76 %. Диагностическая значимость обоих тестов в плане выявления или распознавания ССВО существенно не отличалась, на что указывала площадь под кривой (area under curve, AUC) для ЦРП — 0,84 и ПКТ — 0,84.

Построение классификационного дерева принятия решения о наличии или отсутствии ССВО на бактериемии (фунгемию) позволило сформулировать решающее правило:

— если уровень ЦРП равен или превышает диагностический порог $6,4 \times 10^{-2}$ г/л, то принимают решение о наличии у пациента системного воспалительного ответа, связанного с бактериальным агентом. Процедуру распознавания прекращают, ограничивая исследование регистрацией ЦРП;

— если уровень ЦРП менее $6,3 \times 10^{-2}$ г/л, но больше его значения в норме $0,5 \times 10^{-2}$ г/л, имеющейся информации недостаточно для принятия решения. Процедуру распознавания ССВО повторяют при наличии лихорадки до 38°C или гипотермии (менее 36°C) через 12–24 ч, или

дополнительно привлекают результат параллельного определения уровня прокальцитонина:

1. При уровне прокальцитонина $0,86 \times 10^{-8}$ г/л и более принимают решение о наличии ССВО, ассоциированного с микробным агентом.

2. При уровне прокальцитонина менее $0,858 \times 10^{-8}$ г/л, но более его значения в норме $0,05 \times 10^{-8}$ г/л имеющейся информации для принятия решения недостаточно — прогноз неопределенный. Процедуру распознавания при наличии фебрильной лихорадки повторяют в ближайшие 12–24 ч путем обязательной регистрации уровня ЦРП и при необходимости ПКТ.

3. Если уровень ЦРП менее $0,5 \times 10^{-2}$ г/л — данных за вероятность развития ССВО нет. Процедуру распознавания прекращают, ограничиваясь определением ЦРП. За пациентом продолжают динамическое наблюдение.

Параллельное определение ЦРП и ПКТ у пациентов экзаменационной выборки с призна-

ками фебрильной нейтропении, в соответствии с определенной нами последовательностью действий, позволило с вероятностью 78 % выявить пациентов, способных в течение 24–48 ч развить клинику ССВО на бактериемии, и с вероятностью 56 % выявить пациентов, у которых в течение 24–48 ч не было клиники ССВО.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection inpatients with acute leukemia / G. P. Bodey [et al.] // Ann. Intern. Med. — 1966. — Vol. 66. — P. 328.

2. Clauser, M. P. Infections in patients with Hematologic Malignancies / M. P. Clauser, T. Calandra; ed. by M. A. Clauser, P. A. Pizzo // Management of infections in Immunocompromised patients / — W. B. Saunders Company Ltd., 2000. — P. 141–188.

3. Сепсис в начале XXI в. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение: практ. рук-во / под ред. С. С. Соловьева, Б. Р. Гельфанда. — М.: Литтерра, 2006. — 172 с.

4. Шевченко, Н. И. Прокальцитонин — маркер системной инфекции у онкогематологических пациентов / Н. И. Шевченко, О. П. Логина, А. С. Прокопович // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / ГУ РНПЦ Эпидемиологии и микробиологии. — Минск: ФУАинформ, 2009. — Вып. 2. — С. 476–481.

УДК 616.151.5+616.155.392-053.2-08

ПРИОБРЕТЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ КАК ПРИЧИНА ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ НА ЭТАПАХ ПРОГРАММНОГО ЛЕЧЕНИЯ ДЕТЕЙ С СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ И ЛЕЙКОЗАМИ

В. В. Дмитриев, И. А. Дунаев

Республиканский научно-практический центр
детской онкологии и гематологии, г. Минск

Изменения функционального состояния свертывания крови, регистрируемые в процессе лечения больных онкологическими заболеваниями, в большинстве случаев обусловлены комбинированным дефектом плазменного звена на фоне тромбоцитопении. Достижение диагностического порога для уровня тромбоцитов менее 28×10^9 /л и активности факторов протромбинового комплекса менее 40 % на фоне клиники системного воспалительного ответа, позволяет высказать предположение о развитии спонтанного кровотечения в течение ближайших суток на этапах лечения пациента со злокачественным новообразованием или гемобластозом. Если число тромбоцитов более $28,5 \times 10^9$ /л в сочетании с уровнем активности факторов протромбинового комплекса не менее 40 % и отсутствием ССВО, то можно говорить о том, что изменения свертывания не могут быть самостоятельной причиной кровотечения и не требуют коррекции.

Ключевые слова: дети, злокачественные новообразования, гемобластозы, приобретенные нарушения свертывания крови, прогноз кровотечения.

ACQUIRED ABNORMALITIES IN BLOOD COAGULATION AS A CAUSE FOR HEMORRHAGIC COMPLICATIONS IN THE STAGES OF PROGRAM TREATMENT OF CHILDREN WITH SOLID TUMORS AND LEUKEMIA

V. V. Dmitriyev, I. A. Dunayev

Republican Research Centre for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

The changes of the functional state of blood coagulation, registered in the process of the treatment of oncological patients are caused in the majority of cases by the combined defect of a plasmic component in consequence of thrombocytopenia. The reaching of a diagnostic threshold for the thrombocyte level less than 28×10^9 /l and factor activity of prothrombin complex less than 40 per cent as a result of the clinic of systemic inflammatory response allows of making a supposition that a bleeding develops within a few days at the early stage of the treatment of the patient with malignant neoplasm or hemoblastosis. If the number of thrombocytes is more than $28,5 \times 10^9$ /l in the combination with the level of factor activity of the prothrombin complex no less than 40 per cent or there is no systemic inflammatory response syndrome, the changes of blood coagulation cannot be an independent cause for a bleeding and the correction is not needed.

Key words: children, malignant neoplasms, hemoblastosis, acquired abnormalities in blood coagulation, prognosis for bleeding.

Геморрагические и инфекционные осложнения занимают одно из первых мест среди причин смерти пациентов со злокачественными новообразованиями и гемобластозами [1, 2]. Изменения функционального состояния свертывания крови, регистрируемые в процессе лечения больных онкологическими заболеваниями, в большинстве случаев обусловлены комбинированным дефектом плазменного звена на фоне тромбоцитопении [3]. Для сочетанных нарушений плазменного и тромбоцитарного звена свертывания крови единых критериев, регламентирующих выбор и пороговые значения ключевых лабораторных показателей для распознавания вероятности кровотечения, не существует [4].

Цель исследования

Разработать систему распознавания ситуаций, при которых возможно развитие геморрагических осложнений на этапах лечения детей со злокачественными новообразованиями и гемобластозами.

Материалы и методы исследования

Обследована группа детей (191 пациент) в возрасте от 1 до 17 лет (медиана — 14 лет), находившихся на лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии» с 2007 по 2010 гг. Для решения задачи по прогнозированию геморрагических осложнений из числа обследованных пациентов выделено 2 подгруппы: обучающая выборка — 82 ребенка и экзаменационная выборка — 109 детей. Обучающую выборку сформировали по принципу «case-control»: 41 пациент, у которых на день включения в исследование зарегистрировано спонтанно возникшее кровотечение с объемом кровопотери от 5 до 10 мл/кг массы тела в течение суток, и 41 пациент аналогичного возраста и пола с таким же диагнозом на том же этапе лечения, но без кровотечения. Экзаменационную выборку составили 24 ребенка с кровотечением и 85 детей без кровотечения.

Результаты исследования и их обсуждение

Выявлена тесная корреляционная взаимосвязь между фактом кровотечения с одной стороны, и изменением АПТВ ($G = 0,57$; $p = 0,0012$), активностью факторов протромбинового комплекса ($G = -0,64$; $p = 0,0001$), уровнем ПДФ ($G = 0,48$; $p = 0,002$), степенью тромбоцитопении ($G = -0,64$; $p = 0,00001$), величиной эндогенного потенциала тромбина ($G = -0,59$; $p = 0,0001$) с другой стороны. Для определения чувствительности и специфичности ряда коагуляционных показателей, привлекаемых для распознавания ситуации, при которой возможно кровотечение, были построены характеристические кривые. Наибольшая чувствительность (Se) при максимальной специфичности (Sp) были характерны для активности факторов протромбинового комплекса ($Se = 98\%$ и $Sp = 94\%$; $p = 3,7 \times 10^{-14}$)

и числа тромбоцитов в периферической крови ($Se = 95\%$ и $Sp = 86\%$; $p = 3,7 \times 10^{-10}$). Чувствительность и специфичность показателя эндогенного потенциала тромбина ($Se = 95\%$ и $Sp = 80\%$; $p = 6,5 \times 10^{-8}$) несколько уступали аналогичным параметрам показателя активности факторов протромбинового комплекса. Специфичность и чувствительность других коагуляционных показателей были значительно ниже. Это определило выбор наиболее информативных и независимых друг от друга показателей свертывания, таких как число тромбоцитов и активность факторов протромбинового комплекса, привлекаемых для распознавания ситуации, при которой возможно кровотечение. Учитывая наличие тесной взаимосвязи между величинами активности факторов протромбинового комплекса и эндогенного потенциала тромбина, уступавшего по своей чувствительности и специфичности производному протромбинового времени, показатель эндогенного потенциала тромбина не был привлечен для последующего анализа.

Для пациентов, имевших кровотечение, были характерны: клиника синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) на инфекцию, тромбоцитопения в диапазоне $(2-55) \times 10^9/\text{л}$ и снижение активности факторов протромбинового комплекса в диапазоне 6,5–59%. Большинство пациентов без клиники системного воспалительного ответа с уровнем тромбоцитов более $50 \times 10^9/\text{л}$ и активностью факторов протромбинового комплекса более 50% не имели кровотечения. В каждой из подгрупп обучающей выборки присутствовали пациенты, у которых значения активности факторов протромбинового комплекса и уровня тромбоцитов соответствовали «зоне неопределенности». Поэтому, ориентируясь на любой 1 из 3-х перечисленных признаков, дать правильный ответ о возможности кровотечения не представляется возможным. Данное обстоятельство стало поводом для построения дерева принятия решения с использованием 3-х перечисленных признаков. Для построения дерева принятия решения были использованы результаты обучающей выборки по 41-й паре пациентов.

Выявленные изменения позволили сформулировать решающее правило для принятия решения о возможности возникновения кровотечения на различных этапах химиотерапии детей с гемобластомами и злокачественными новообразованиями:

1. Если нет клинических признаков ССВО, то кровотечение возможно при снижении уровня тромбоцитов менее $16,5 \times 10^9/\text{л}$.

2. Если число тромбоцитов менее $28,5 \times 10^9/\text{л}$ в сочетании со снижением активности факторов протромбинового комплекса менее 40% на фоне доказанного ССВО, то можно говорить о том, что изменения свертывания могут сопровождаться кровотечением. Пациент нуждается в неотложной ситуационной коррекции свертывания крови.

3. Если число тромбоцитов более $28,5 \times 10^9/\text{л}$ в сочетании с уровнем активности факторов протромбинового комплекса не менее 40 % и отсутствием клиники ССВО, то можно говорить о том, что изменения свертывания крови не могут быть самостоятельной причиной кровотечения. Пациент не нуждается в неотложной ситуационной коррекции свертывания крови.

4. Если 1 или 2 из 3-х названных признаков достигают (или не достигают) диагностический порог (доказанный ССВО, активность факторов протромбинового комплекса менее 40 % и содержание тромбоцитов крови менее $28,5 \times 10^9/\text{л}$), то имеющейся информации недостаточно для принятия решения, процедуру распознавания повторяют через 12–24 ч.

Для оценки эффективности предлагаемого способа распознавания ситуации, при которой возможно кровотечение, обследована экзаменационная выборка из 109 пациентов. На день включения в исследование по результатам обследования для каждого пациента экзаменационной выборки было сформулировано заключение о возможности (или не возможности) кровотечения в течение ближайших 24 ч. В зависимости от исхода ситуации через сутки выделено 2 подгруппы: 1-я подгруппа больных с кровотечением — 24 пациента, 2-я подгруппа — 85 детей, у которых в течение ближайших суток кровотечения не было.

Экспертиза прогноза вероятности кровотечения после оценки ситуации по 3 признакам показала, что положительный прогноз кровотечения был сформулирован у 19 пациентов из 24-х, у которых кровотечение имело место. В 5 наблюдениях — был высказан отрицательный прогноз. Из 85 пациентов, у которых не было кровотечения,

прогноз об отсутствии кровотечения был высказан в адрес 70 пациентов. У 15 пациентов было заподозрено кровотечение. Специфичность (Sp) метода по результатам оценки экзаменационной выборки достигла $70/85 = 0,82$; чувствительность (Se) составила $19/24 = 0,79$. Правильных ответов — 89 (82 %), ошибочных — 20 (18 %).

Таким образом, определение диагностического порога уровня тромбоцитов менее $28 \times 10^9/\text{л}$ и активности факторов протромбинового комплекса менее 40 % у пациентов с клиникой доказанного системного воспалительного ответа на генерализацию инфекционного процесса позволяет высказать предположение о развитии геморрагических осложнений в течение ближайших суток. Если нет признаков ССВО, ассоциированного с инфекцией, то кровотечение возможно при снижении уровня тромбоцитов менее $16,5 \times 10^9/\text{л}$. Если число тромбоцитов более $28,5 \times 10^9/\text{л}$ в сочетании с уровнем активности факторов протромбинового комплекса не менее 40 % и отсутствием ССВО, то можно говорить о том, что изменения свертывания не могут быть самостоятельной причиной кровотечения, а пациент не нуждается в неотложной ситуационной гемостатической терапии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Румянцев, А. Г. Сопроводительная терапия и контроль инфекций при гематологических и онкологических заболеваниях / А. Г. Румянцев, А. А. Масчан, Е. В. Самочатова. — М.: Медпрактика-М, 2006. — 504 с.
2. Bleeding and thrombosis in acute leukemia: what does the future of therapy look like? // R. Frederick [et al.] // *Thrombosis Research*. — 2007. — Vol. 120, № 2. — P. 99–106.
3. Дмитриев, В. В. Селективная коррекция нарушений гемостаза у детей с острым лейкозом и злокачественными новообразованиями / В. В. Дмитриев, И. А. Дунаев // *Онкогематология*. — 2009. — № 4. — С. 22–26.
4. Румянцев, А. Г. Клиническая трансфузиология / А. Г. Румянцев, В. А. Аграненко. — М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1988. — 575 с.

УДК 616.155.392-08-036.12

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИМАТИНИБА (ГЛИВЕК) В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Е. В. Зуховицкая¹, О. П. Чайковская¹, Н. Ф. Василевская², Ю. Н. Селило²

¹Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно

²Гродненская областная клиническая больница, г. Гродно

Изучена эффективность лечения иматинибом у 15 больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), находящихся на различных фазах заболевания на базе гематологического отделения УЗ «Гродненская областная клиническая больница». Эффективность терапии оценивали по качественным параметрам, к которым относятся: динамика размеров селезенки, данные клинического и биохимического анализов крови, морфологического анализа костного мозга, клинической эффективности и долгосрочных результатов, а также безопасность лекарственного препарата иматиниба у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, толерантным к традиционной цитостатической терапии в хронической фазе и в фазе акселерации при многократном использовании. Лечение начиналось с дозы 400 мг/сутки.

К концу 3-го мес. от начала лечения иматинибом был получен полный гематологический ответ у 86 % больных ХМЛ с хронической фазой и продвинутой фазой болезни, что является хорошим результатом для широкой клинической практики. Проведенная работа показала, что препарат обладает высокой эффективностью, хорошей переносимостью и относительно редко вызывает гематологические и не гематологические осложнения в сравнении с традиционной проводимой химиотерапией. Лечение иматинибом значительно улучшило результаты терапии больных с прогрессирующей стадией болезни и позволило получить клиническую и гематологическую ремиссию.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, иматиниб, полный гематологический ответ.

RESULTS OF THE APPLICATION OF IMATINIB (GLIVEK) IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC MYELOLEUKEMIA

E. V. Zuhovitskaya¹, O. P. Chaikovskaya¹, N. F. Vasilevskaya², Yu. N. Selilo²

¹Grodno State Medical University

²Grodno Regional Clinical Hospital

The efficacy of the treatment of 15 patients with chronic myeloleukemia (CML) of different severity in the Hematology Department of the Gomel Regional Clinical Hospital has been studied. The therapy efficacy was assessed by qualitative parameters, which include dynamics of spleen size, data on clinical and biochemical blood tests, morphological analysis of marrow for clinical efficacy and long-term results and safety of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia, tolerant to traditional cytostatic therapy in the chronic phase and acceleration phase in multiple use. The treatment 1st included the dose of 400 mg/day.

The full hematological response was received in 86 % patients with CML in its chronic or advanced phases by the end of three months from the beginning of the treatment with imatinib, which was a good result for wide clinical practice. The performed research showed that the preparation was highly effective, possessed good tolerance and relatively seldom caused hematological and non-hematological complications in comparison with the traditionally performed chemotherapy. The treatment with imatinib considerably improved the results of the therapy of the patients with the progressing stage of the disease and made it possible to receive clinical and hematological remission.

Key words: chronic myeloleukemia, imatinib, full hematological response.

Существенные успехи в лечении хронического миелолейкоза (ХМЛ) связаны с открытием принципиально новых, патогенетически направленных препаратов, создание которых позволило по-другому взглянуть на проблему терапии этого заболевания.

Иматиниб мезилат (Гливек) — первый селективный ингибитор тирозинкиназы, который подавляет пролиферацию и апоптоз клеточных линий, позитивных по Bcr-Abl, а также молодых лейкозных клеток у пациентов хроническим миелолейкозом с положительной Филадельфийской хромосомой [1-3]. Точно направленный механизм действия препарата обеспечивает его высокую противоопухолевую активность, низкую токсичность лечения и хорошее качество жизни пациентов [4]. Подтверждена возможность эффективного лечения пациентов хроническим миелолейкозом в хронической фазе после неудачного применения традиционной терапии (гидроксимочевина, бусульфан, α -интерферон), а также в продвинутых стадиях заболевания [5]. Несмотря на очевидные успехи в лечении ХМЛ, ряд проблем с применением иматиниба остается нерешенным.

Цель исследования

Оценка клинической эффективности и долгосрочных результатов, а также безопасности

лекарственного препарата иматиниба у пациентов с хроническим миелолейкозом, толерантным к традиционной цитостатической терапии в хронической фазе и в фазе акселерации при многократном использовании.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 15 взрослых пациентов: 5 (33 %) мужчин и 10 (67 %) женщин, получавших терапию в отделении гематологии УЗ «ГОКБ» с последующим лечением иматинибом в амбулаторных условиях. Средний возраст пациентов составил — $43,5 \pm 11,8$ года. У всех больных был верифицирован диагноз ХМЛ с наличием Филадельфийской хромосомы, в хронической фазе, толерантным к традиционной терапии и в фазе акселерации. Один пациент (код 08) исключен из исследования после 19 дней приема иматиниба в связи с индивидуальной непереносимостью препарата, проявившейся не купируемой приемом антигистаминных препаратов генерализованной кожной сыпью. Сроки наблюдения за больными составили от 1 до 75 (медиана — 35) мес. Продолжительность заболевания до начала терапии иматинибом была от 0 до 42 (медиана — 25) мес. Показатели, используемые для оценки гематологического статуса больных на момент начала терапии иматинибом, представлены в таблице 1, 2.

Таблица 1 — Показатели периферической крови на момент начала исследования

Код	Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	Миелоциты + метамиелоциты (%)	Бласты + промиелоциты (%)	Базофилы (%)	Тромбоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	Гемоглобин (г/л)
01	32,0	6	0	3	420,0	153,0
02	25,7	4	2	0	210,0	126,0
03	44,2	8	3	4	93,0	111,0
04	46,5	12	12	16	85,0	105,0

Окончание таблицы 1

Код	Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	Миелоциты + метамиелоциты (%)	Бласты + промиелоциты (%)	Базофилы (%)	Тромбоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	Гемоглобин (г/л)
05	29,7	11	1	7	435,0	120,0
06	84,6	7	15	3	399,0	106,0
07	47,1	7	0	3	438,0	124,0
08	39,3	3	0	4	157,0	146,0
09	45,2	0	0	1	239,0	135,0
10	42,3	0	0	0	448,0	115,0
11	33,8	5	5	29	168,0	119,0
12	62,2	8	9	14	542,0	95,0
13	43,6	2	3	5	236,0	116,0
14	48,4	23	15	8	118,0	104,0
15	28,2	3	2	3	316,0	122,0

Таблица 2 — Результаты анализа аспирата костного мозга на момент начала исследования

Код	Бласты	Промиелоциты	Миелоциты	Метамиелоциты	Палочко-ядерные	Сегментоядерные	Эозинофилы	Базофилы	Лимфоциты	Моноциты	Красный ряд
01	1,50	4,75	9,75	10,00	15,00	45,50	1,25	0,75	5,75	2,50	2,75
02	3,25	3,75	5,50	10,75	18,50	24,00	2,50	0,00	16,00	2,25	13,00
03	3,50	13,25	16,75	15,25	20,25	19,00	4,50	1,00	1,25	2,00	2,75
04	8,00	6,75	9,75	10,00	11,50	11,00	0,00	13,25	9,75	4,50	16,50
05	2,00	6,00	13,25	15,25	23,00	23,00	2,50	0,75	1,75	2,25	7,50
06	13,75	12,00	10,75	11,25	15,00	16,00	4,75	9,75	1,75	3,75	6,75
07	2,75	4,75	10,50	12,75	18,75	15,00	2,50	0,50	8,50	2,25	20,00
08	5,75	6,75	10,00	11,00	21,75	29,00	1,00	0,25	1,75	2,25	9,00
09	2,75	4,50	5,25	11,25	15,50	18,00	5,00	0,00	11,25	3,25	21,25
10	6,00	4,75	6,50	9,75	19,25	20,50	1,75	0,00	6,00	6,25	17,00
11	6,00	20,25	27,00	20,00	10,00	7,25	3,50	1,50	3,00	1,00	1,00
12	7,00	8,00	7,50	12,75	18,75	27,00	2,00	1,75	2,00	6,00	16,75
13	2,50	4,50	9,50	12,00	21,75	22,00	2,00	0,00	9,50	2,50	13,00
14	2,75	12,25	8,25	11,75	20,50	26,25	1,25	6,00	5,25	4,25	11,75
15	2,00	2,50	5,50	7,50	11,25	36,25	5,25	0,00	12,00	3,00	14,25

В работе использована модифицированная классификация признаков ХМЛ в фазе акселерации, предложенная Н. М. Kantarjian и соавт. в 1992 г. [6]. Данную фазу диагностировали при соблюдении хотя бы одного из следующих критериев: 1) 10–19 % бластных клеток в периферической крови и (или) костном мозге; 2) сумма бластных клеток и промиелоцитов в периферической крови и (или) костном мозге $> 20\%$; 3) $> 20\%$ базофилов в периферической крови и (или) костном мозге; 4) персистирующая тромбоцитопения ($< 100 \times 10^9/\text{л}$), не связанная с терапией; 5) прогрессирующая спленомегалия и лейкоцитоз, резистентные к терапии; 6) появление дополнительных цитогенетических аномалий.

В соответствии с вышеперечисленными критериями у 6 больных (код 5, 6, 7, 11, 12, 14) в исследовании регистрировалась фаза акселерации ХМЛ.

Лечение иматинибом начинали со стартовой дозы 400 мг/сут. Динамику ответа на терапию оценивали на основании динамики размеров селезенки, данных клинического и биохимического анализов крови, морфологического

анализа костного мозга (через первые 3 мес. и далее каждые 6 мес.) после начала лечения иматинибом. Достижение полного гематологического ответа (ПГО) определяли в случае соблюдения следующих критериев: нормализация показателей периферической крови (лейкоциты в общем анализе крови не более $10 \times 10^9/\text{л}$ при абсолютном числе нейтрофилов $> 1,5 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты – не более $450 \times 10^9/\text{л}$, отсутствие в лейкоцитарной формуле бластов и менее 5 % базофилов) и костного мозга (бласты $< 5\%$); а также нормализация размеров селезенки.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют, что через 3 месяца терапии иматинибом у 12 (86 %) из 14 больных, завершивших исследование, была достигнута ПГО.

Следует отметить, что ПГО был зафиксирован уже через 6 недель от начала приема препарата у 13 (92 %) больных. Однако, у одного больного (код 14) через 3 мес. исследования были отмечены признаки прогрессии лейкоемического процесса, проявившиеся повышением

уровня лейкоцитов периферической крови, выраженным «левым сдвигом» лейкоцитарной формулы: содержание бластов и промиелоцитов достигло 21 %, миелоцитов и промиелоцитов — 24 %. К 6 мес. терапии у данного больного нормализовалась лейкоцитарная формула, однако уровень лейкоцитов периферической крови несколько превысил референтные значения, определяющие статус полной гематологической ремиссии.

У единственной пациентки (код 06) полная гематологическая ремиссия не была зафиксирована в течение всего времени приема исследуемого препарата: уровень тромбоцитов периферической крови, составлявший на момент начала исследования $399 \times 10^9/\text{л}$, на фоне приема иматиниба значительно повысился, достигнув максимума, составившего $1067 \times 10^9/\text{л}$ к концу 1-го месяца лечения, после чего начал постепенно снижаться. Однако к концу 3-го мес. терапии показатели тромбоцитов значительно превышали норму ($902 \times 10^9/\text{л}$). ПГО оставалась стабильным (длительность > 12 мес.) у 11 (73 %) больных. Кратковременная потеря ПГО вследствие перерывов в лечении наблюдалась у 3 (21 %) больных и затем была достигнута вновь на прежней или увеличенной дозе.

Гематологическая токсичность: снижение уровня нейтрофилов периферической крови $< 1 \times 10^9/\text{л}$ на фоне приема иматиниба отмечена у 3 (21 %) больных. У одной пациентки (код 11) нейтропения зафиксирована неоднократно: на 12-й неделе терапии уровень нейтрофилов периферической крови составил $0,93 \times 10^9/\text{л}$, на 16-й неделе — $0,64 \times 10^9/\text{л}$. Вместе с тем, после краткосрочной отмены препарата (на 1–3 дня) уровень нейтрофилов восстанавливался, не приводя к развитию инфекционных осложнений. Однократное снижение уровня нейтрофилов периферической крови отмечено у 2-х больных. Пациент (код 07): через 3 мес. нейтрофилы понизились до $0,9 \times 10^9/\text{л}$, в течение недели отмены препарата повысились до $1,89 \times 10^9/\text{л}$, в связи с чем прием иматиниба возобновлен в дозе 400 мг/сут, далее в течение всего времени исследования эпизодов нейтропении не отмечалось. Пациент (код 15): нейтропения ($0,4 \times 10^9/\text{л}$) зафиксирована через 3 мес. лечения, препарат временно был отменен с послед-

ующим повышением уровня нейтрофилов до $1,62 \times 10^9/\text{л}$ — в течение 12 дней. Эпизодов развития тромбоцитопении с уровнем клеток в периферической крови $< 50 \times 10^9/\text{л}$ в группе исследуемых больных не зафиксировано.

Вместе с тем значимого изменения уровней биохимических показателей, рекомендованных в качестве критериев оценки возникновения возможных не гематологических побочных эффектов исследуемого препарата (а именно: гипертрансаминаземии > 5 норм или гипербилирубинемии > 3 норм) не отмечено ни у одного пациента. Значимая негематологическая токсичность (оссалгии, миалгии, желудочно-кишечные расстройства, аллергические высыпания) наблюдалась у 3 (21 %) пациентов и имела место в первые месяцы лечения иматинибом.

В настоящее время все пациенты, получавшие иматиниб, живы и находятся на поддерживающей терапии данным препаратом.

Заключение

1. С начала лечения иматинибом (2008 г.) препарат показал свою высокую эффективность, хорошую переносимость и относительную редкость гематологических и не гематологических осложнений в сравнении с традиционно проводимой химиотерапией.

2. Появление иматиниба значительно улучшило результаты терапии больных с прогрессирующей стадией болезни и позволило получить клиническую и гематологическую ремиссию.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia / M. Baccarani [et al.] // *Net. Blood.* — 2006. — Vol. 108. — P. 1809–1820.
2. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia / B. J. Druker [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344. — P. 1031–1037.
3. Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL-positive cells / B. J. Druker [et al.] // *Nat. Med.* — 1996. — Vol. 2. — P. 561–566.
4. Goldman, J. M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era / J. M. Goldman // *Blood.* — 2007. — Vol. 110. — P. 2828–2837.
5. Hehlmann, R. On behalf of the European Leukemia Net: Chronic myeloid leukemia / R. Hehlmann, A. Hochhaus, M. Baccarani // *Lancet.* — 2007. — Vol. 370. — P. 342–350.
6. Treatment of advanced stages of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with interferon and low-dose cytarabine / H. M. Kantarjian [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 1992. — Vol. 10. — P. 772–778.

УДК 616-006.448-08-036.66

ПОДДЕРЖИВАЮЩАЯ ТЕРАПИЯ РЕМИССИИ У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

И. А. Искров¹, А. Л. Усс¹, В. В. Смольникова², Д. Г. Цвирко³, В. А. Змачинский⁴

¹Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

²9-я городская клиническая больница, г. Минск;

³Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск

⁴Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

Высокодозная химиотерапия (ВХТ) с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) позволяет достигать ремиссии у 90 % пациентов с множественной миеломой.

К сожалению, длительность такой ремиссии не превышает 3-х лет. Разработка методов поддержания ремиссии и контроля минимальной остаточной болезни у пациентов с множественной миеломой является актуальной задачей врачей-гематологов.

В группе пациентов, получавших α -интерферон, после ВХТ с двойной ауто-ТГСК частота ремиссий статистически значимо выше ($p < 0,05$), а частота рецидивов статистически значимо ниже ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов, при лечении которых α -интерферон не использовался.

Ключевые слова: множественная миелома, двойная аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови, высокодозная химиотерапия, терапия поддержания ремиссии, минимальная остаточная болезнь.

MAINTENANCE THERAPY OF REMISSION IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

I. A. Iskrov¹, A. L. Uss¹, V. V. Smolnikova², D. G. Tsvirko³, V. A. Zmachinsky⁴

¹Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel

²Municipal Clinical Hospital № 9,

³Republican Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

⁴Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk

High-dose chemotherapy (HDC) followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) can achieve remission in 90 % patients with multiple myeloma. Unfortunately, the duration of this remission is less than 3 years. The development of the methods to maintain the remission and to control minimal residual disease in patients with multiple myeloma is a pressing task for hematologists.

In the group of the patients treated with α -interferon, after HDC with autologous HSCT the dual response rate was significantly higher ($p < 0,05$) and relapse rates were significantly lower ($p < 0,05$) in comparison with the group of patients treated that α -interferon.

Key words: multiple myeloma, a double autologous transplantation of hematopoietic stem cell, high-dose chemotherapy, therapy to maintain remission, minimal residual disease.

Введение

Новые программы терапии с использованием талидомида, бортезомиба, леналидомида, а также высокодозной химиотерапии с трансплантацией стволовых кроветворных клеток позволяют улучшить результаты лечения больных множественной миеломой (ММ).

Однако даже с использованием современных программ терапии средняя длительность ремиссии у большинства больных ММ не превышает 3-х лет.

Вопрос о рациональном лечении больных в ремиссии до сих пор остается нерешенным [1]. По мнению большинства исследователей, химиотерапия должна продолжаться в течение 1–2 лет до достижения «фазы плато». Понятие «фаза плато» используется для оценки эффективности лечения. Фаза плато подразумевает период стабилизации заболевания при отсутствии признаков его прогрессирования, стабильный уровень парапротеина в сыворотке и моче, сохраняемый в течение 3–6 мес. После достижения фазы плато лечение может быть прервано, так как проведение поддерживающей химиотерапии не улучшает выживаемости больных [2]. Продолжать стандартную химиотерапию после достижения стабилизации не имеет смысла [3]. Несколькими рандомизированными исследованиями показали, что поддерживающая терапия алкилирующими агентами не увеличивала общую выживаемость [4].

Высокодозная химиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ВХТ с ауто-ТГСК) сегодня рассматривается в качестве терапии первой линии у больных ММ в возрасте до 60–65 лет.

С целью контроля минимальной остаточной болезни для поддержания ремиссии после высокодозной терапии изучается назначение α -интерферона. D. Cunningham и соавт. показали, что назначение α -интерферона в дозе 3 млн МЕ/м² 3 раза в неделю позволяет достигать медианы безрецидивной выживаемости до 42 мес. по сравнению с 27 мес. в контрольной группе без лечения. В. Vjorkstrand с соавт. в ретроспективном анализе показали, что назначение α -интерферона после высокодозной терапии увеличивает не только безрецидивную выживаемость на 9 мес., но и почти на 2,5 года общую выживаемость.

Для точной и оперативной оценки противоопухолевой эффективности этапов терапии и выбора ее общего алгоритма необходимо применение высокочувствительных методов выявления минимальной остаточной болезни. На сегодняшний день оптимальным, с точки зрения чувствительности и доступности, методом определения клональных маркеров миеломных клеток следует считать многоцветную проточную цитометрию, которая позволяет выявлять 1 опухолевую клетку на 10–100 тыс. миелокариоцитов.

Применение этого метода контроля минимальной остаточной болезни (МОБ) позволяет построить алгоритм терапии с оптимальным сочетанием противоопухолевой эффективности и переносимости, что должно привести к достижению максимально возможных отдаленных результатов.

Материалы и методы исследования

Больному с установленным по стандартным критериям диагнозом ММ и определенным с помощью многоцветной проточной цитометрии исходным иммунным фенотипом миеломных плазматических клеток проводили терапию индукции ремиссии. ВХТ с двойной ауто-ТГСК была проведена 26 пациентам с ММ.

После проведения 2-го курса ВХТ через 3 и 6 мес. определяли содержание МПК в костном мозге. Пациентов с содержанием МПК в пределах 0–5 % переводили на поддерживающую терапию препаратами α -интерферона.

Пятеро пациентов, трое мужчин и две женщины, с ММ после 2-х курсов ВХТ с ауто-ТГСК получали поддерживающую терапию в

виде подкожного введения α -интерферона 3 млн МЕ 3 раза в неделю.

Один пациент в связи с непереносимостью интерферона (боли в мышцах, депрессия) прекратил прием препарата. В последующем у него развился рецидив заболевания, по поводу которого он получал терапию бортезомибом.

Оставшиеся 4 пациента продолжают поддерживающую терапию и находятся в состоянии истинной ремиссии.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе частоты ошибочных (ложноположительных и ложноотрицательных) прогнозов диагностических методов: многоцветной проточной цитометрии и цитоморфологического подсчета опухолевых клеток, были выявлены статистически значимые различия. Использование многоцветной проточной цитометрии позволило нам с более высокой точностью отслеживать содержание опухолевых клеток на различных этапах терапии. Результаты расчетов приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Ошибки прогнозирования при использовании различных диагностических методов в группе пациентов с двойной аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток

Метод диагностики	Количество ошибочных прогнозов	Количество верных прогнозов	p
Многоцветная проточная цитометрия	0	28	0,004
Цитоморфологический метод	8	20	

Так, у пациента С. Л. Н. после 2-го курса ВХТ в костном мозге наблюдается нормальное содержание плазматических клеток (1,5 %), но сохраняются клональные миеломные плазматические клетки (0,03 %). Динамика уменьшения опухолевого клона соответствовала положитель-

ной динамике клинико-лабораторного статуса пациентов — уменьшению и исчезновению клинических и биохимических проявлений болезни.

Результаты поддерживающей терапии α -интерфероном у пациентов с ММ после ВХТ с двойной ауто-ТГСК представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Результаты поддерживающей терапии α -интерфероном у пациентов с множественной миеломой после высокодозной терапии с двойной аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток

Вариант поддерживающей терапии	Рецидив	Ремиссия	p
Без интерферона	19	3	0,0023
С интерфероном	0	4	

Были выявлены статистически значимые различия между группами пациентов, у которых применялись различные варианты поддерживающей терапии: с интерфероном и без интерферона.

Длительность наблюдения в этой группе пациентов после начала терапии поддержания ремиссии составила 460 дней (367–753 дня), терапия будет продолжена до начала рецидива или достижения 5 лет наблюдения.

Выводы

1. Уровень клональных плазматических клеток в костном мозге по результатам многоцветной проточной цитометрии является наиболее значи-

мым критерием противоопухолевого эффекта проводимой терапии, не зависящим от секреторной способности опухолевых клеток и продолжительности циркуляции миеломного парапротеина.

2. В соответствии с этим критерием результатом терапии может быть достижение «иммунофенотипической» полной ремиссии (клональные плазматические клетки в костном мозге не определяются, либо они присутствуют вместе с неклональными в суммарном количестве до 1,5 %), полной ремиссии (уровень клональных клеток до 1,5 %), частичной ремиссии (уровень клональных клеток от 1,5 до 5 %).

Для поддержания ремиссии заболевания пациенты с ММ после проведения ВХТ с двойной ауто-ТГСК нуждаются в длительной терапии α -интерфероном в дозе 3 млн МЕ 3 раза в неделю подкожно длительно или до развития рецидива. В группе пациентов, получавших α -интерферон, частота ремиссий статистически значимо выше ($p < 0,05$), а частота рецидивов статистически значимо ниже ($p < 0,05$) по сравнению с группой пациентов, при лечении которых α -интерферон не использовался.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Андреева, Н. Е. Множественная миелома: прошлое, настоящее, будущее / Н. Е. Андреева // Гематология и трансфузиология. — 1998. — № 3. — С. 4–10.
2. Алкеран, лейкеран, милеран, 6-меркаптопурин, тиогуанин, веллферон, зовиракс в онкологической практике / М. А. Волкова [и др.]; под ред. М. А. Волковой. — М.: Полигран, 1994. — 96 с.
3. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council Trials between 1980 and 2002 / B. M. Augustson [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23. — P. 9219–9226.
4. MacLennan, I. C. Objective evaluation of the role of vincristine in induction and maintenance therapy for myelomatosis. Medical Research Council Working Party on Leukaemia in Adults / I. C. MacLennan, J. Cusick, Br. J. Cancer. — 1985. — Vol. 52, № 2. — P. 153–158.

УДК 616.5-08+616.72-002

АУТОФИБРОНЕКТИН-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ КОНЦЕНТРАТ (АФТК) В ЛЕЧЕНИИ ТРОФИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОРРАГИЧЕСКИМИ ВАСКУЛИТАМИ И РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

З. К. Карабудагова, С. А. Васильев, В. Л. Виноградов,
А. А. Козлов, Е. Е. Ефремов, Г. Ю. Белинин

Федеральное государственное бюджетное учреждение гематологический научный центр Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Москва

Для повышения эффективности терапии трофических расстройств кожных покровов (эрозий и язв) нами разработан новый метод лечения с применением аутофибронектин-тромбоцитарного концентрата (АФТК). Метод основан на том, что обогащенную тромбоцитами аутоплазму пациента инкубируют на холоду с нефракционированным гепарином. АФТК используется для местного лечения трофических эрозий и язв кожи. При геморрагических васкулитах и ревматоидном артрите АФТК-эффективность заживления эрозивных поражений кожи составляет 100 %; заживление трофических язв кожи отмечается в 93 % случаев.

Ключевые слова: плазменный фибронектин, ростовой фактор тромбоцитов, тромбоциты, аутофибронектин-тромбоцитарный концентрат, трофические поражения кожи, геморрагический васкулит, ревматоидный артрит.

AUTOFIBRONEKTIN-THROMBOCYTE CONCENTRATE IN THE TREATMENT FOR TROPHIC SKIN LESIONS IN PATIENTS WITH ACUTE VASCULAR PURPURA AND ATROPHIC ARTHRITIS

Z. K. Karabudagova, S. A. Vasiliev, V. L. Vinogradov,
A. A. Kozlov, E. E. Yefremov, G. Yu. Belinin

Federal State Budget Institution Hematological Research Centre of Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow

To increase the efficacy of the therapy of trophic skin lesions (erosions, sores), we have developed a new treatment method with the application of autofibronektin-thrombocyte concentrate (AFTC). The method lies in the fact that a patient's thrombocyte-enriched autoplasm is cold incubated with non-fractional heparin. AFTC is used for local treatment for trophic skin erosions and sores. AFTC-efficacy of skin erosions healing makes up 100 % in acute vascular purpura and atrophic arthritis, the healing of skin sores is observed in 93 % cases.

Key words: plasmic fibronektin, thrombocyte growth factor, thrombocyte, autofibronektin-thrombocyte concentrate (AFTC), trophic skin lesions, acute vascular purpura, atrophic arthritis.

Введение

Лечение трофических поражений кожных покровов и соединительных тканей при геморрагических васкулитах и ревматоидном артрите является в настоящее время актуальной проблемой. Одними из важнейших естественных репаративных организмов человека (факторов

заживления трофических повреждений органов и тканей) являются плазменный фибронектин и ростовые факторы тромбоцитов [1]. Клиническая эффективность плазменного фибронектина при лечении эрозивных и язвенных поражений кожи впервые была показана в работах С. А. Васильева и соавт. [2].

Цель исследования

Разработка метода лечения трофических поражений кожных покровов с применением АФТК у пациентов с геморрагическим васкулитом и ревматоидным артритом.

Материалы и методы исследования

Исследовалась плазма крови и тромбоциты пациентов с геморрагическими васкулитами и ревматоидным артритом. При помощи методов иммуноферментного анализа (ELISA) определяли концентрацию плазменного фибронектина, фибриногена, ростового фактора тромбоцитов. Уровень фактора Виллебранда оценивали по ристоцетин-кофакторной активности.

Обследовано 18 больных: 12 пациентов с геморрагическими васкулитами (5 мужчин и 7 женщин в возрасте от 17 до 46 лет) и 6 больных ревматоидным артритом (2-е мужчин и 4 женщины в возрасте от 20 до 38 лет).

Плазму пациентов, обогащенную тромбоцитами, для выделения АФТК получали при помощи метода прерывистого плазмафереза.

Результаты исследования и их обсуждение

Для повышения эффективности терапии трофических расстройств кожных покровов (эрозий и язв) нами разработан новый метод лечения с применением АФТК. Метод заключается в том, что обогащенную тромбоцитами аутоплазму пациента инкубируют на холоду с нефракционированным гепарином; полученный преципитат отделяют центрифугированием и затем ресуспендируют в растворе стерильного гидрокарбоната натрия. Полученную среду наносят на область трофического поражения от 2 до 4-х раз в день. По нашим данным, АФТК содержит большое количество плазменного фибронектина (1,5–2 мг/мл), фибриногена (0,7–1,1 г/л), фактора Виллебранда (45–59 %), тромбоцитарного фактора роста (53–61 %) и тромбоцитов (250–340 тыс. в мкл).

Нами впервые проведено клиническое исследование с применением АФТК — местное лечение трофических эрозий и язв кожных покровов, преимущественно, дистальных областей нижних конечностей у пациентов с геморрагическими васкулитами и ревматоидным артритом. Длительность трофических поражений кожных покровов составляла у пациентов от 1 до

4 мес. Традиционная терапия трофических расстройств была малоэффективна.

Первоначально пораженную поверхность обрабатывали 3 %-ной перекисью водорода, затем на область поражения наносили АФТК и давали ему подсохнуть в течение 10–15 мин. Область трофического поражения после каждого нанесения АФТК закрывали легкой марлевой повязкой.

Эффективность заживления эрозивных поражений кожи составила 100 %; заживление трофических язв кожи отмечено в 93 % случаев. Трудности заживления отмечались у больных с язвами более чем 3-х-месячной давности. Сроки рубцевания и полной репарации язвенных дефектов кожных покровов отмечались через 8–12 суток. Лечение АФТК хорошо переносится пациентами, общих и местных негативных реакций не отмечено. Наблюдение за пациентами в течение 6 мес. — 2-х лет показало, что процесс репарации носит стабильный характер: ни у одного больного рецидивов трофических язв и эрозий не наблюдалось.

Заключение

Таким образом, нами разработан новый метод местного лечения трофических поражений кожных покровов (эрозий и язв) с применением АФТК. АФТК содержит большое количество плазменного фибронектина, фибриногена, фактора Виллебранда, ростового фактора тромбоцитов и тромбоцитов. АФТК обладает высоким стимулирующим репаративным потенциалом и приводит к 100 % заживлению эрозий и 93 % заживлению трофических язв кожных покровов в короткие сроки его применения. АФТК хорошо переносится пациентами, местных и общих реакций не отмечается. Мы рекомендуем использовать АФТК для местного лечения эрозивных и язвенных поражений кожных покровов у пациентов с геморрагическими васкулитами и ревматоидным артритом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Плазменный гепариновый преципитат как источник фибронектина для лечения больных с трофическими поражениями кожи / С. А. Васильев [и др.] // Терапевтический архив. — 1987. — № 6. — С. 127–130.
2. Клиническая эффективность аутофибронекина, полученного методом гепаринокриопреципитации у больных с трофическими поражениями кожи / С. А. Васильев [и др.] // Терапевтический архив. — 1991. — № 11. — С. 82–85.

УДК 616.419-006.448

АБЕРРАНТНОСТЬ ИММУНОФЕНОТИПА КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРВИЧНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМАХ

Н. Н. Климович¹, Т. И. Козарезова¹, В. В. Смольникова²,
Л. В. Колбаско², Д. И. Суворов³, И. А. Искров³

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

²9-я городская клиническая больница, г. Минск

³Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

Метод иммунофенотипирования позволяет определять и разграничивать специфические клеточные антигенные детерминанты, что дает возможность установления критериев распознавания морфологически недифференцируемых нормальных и патологических клеток. При миелодиспластических синдромах лейкозные

клон клеток имеет однородные морфоцитохимические характеристики и является гетерогенным по антигенной структуре бластных элементов, что определяет перспективы его иммунофенотипического изучения. При гетерогенности клеточной популяции у пациентов с миелодиспластическими синдромами иммунофенотип клеток костного мозга обнаруживает высокое диагностическое значение. Данный метод может служить инструментом для дифференциальной диагностики различных вариантов миелодиспластических синдромов и применяться при разработке прогностических критериев для этой патологии.

Ключевые слова: первичные миелодиспластические синдромы, иммунофенотип, костный мозг.

IMMUNOPHENOTYPE ABERRANCE OF MARROW CELLS IN PRIMARY MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

N. N. Klimkovich¹, T. I. Kozarezova¹, V. V. Smolnikova²,
L. V. Kolbasko², D. I. Suvorov³, I. A. Iskrov³

¹Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk

²Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

³Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Minsk

The immunophenotyping method makes it possible to detect and delimit specific cellular antigenic determinants, which enables to establish the criteria for the identification of morphologically non-differentiable normal and pathologic cells. A leukemic cell clone has homogenous morphochemical characteristics in myelodysplastic syndromes. It is heterogenic in its antigenic structure of blastic elements which determines the prospects for its immunophenotypic investigation.

The immunophenotype of marrow cells displays a high diagnostic value by the heterogeneity of the cellular population in the patients with myelodysplastic syndromes. The given method may serve as a tool for differentiative diagnosis for different myelodysplastic syndromes and can be used in the elaboration of the prognostic criteria for this pathology.

Key words: primary myelodysplastic syndromes, immunophenotype, marrow.

Метод иммунофенотипирования позволяет дать характеристику клетке по ее функциональным рецепторам, и большой интерес исследователей к применению этого метода в гематологии определяет возможность установления критериев распознавания морфологически недифференцируемых нормальных и патологических клеток. С появлением высокоспецифичных моноклональных антител, позволяющих определять и разграничивать специфические антигенные детерминанты, современная медицина получила возможность достоверной диагностики, прогноза и выбора наиболее оптимальной тактики терапии. Неоспоримыми достоинствами иммунофенотипирования являются его высокая чувствительность, специфичность и относительная простота. При этом наибольшее значение и развитие метод иммунофенотипирования получил при болезнях крови, где является обязательным тестом, в первую очередь, для опухолевых гематологических заболеваний с высоким процентом бластных клеток. Однако, современная гематология все чаще использует метод иммунофенотипирования в диагностике и определении прогноза заболеваний с относительно невысоким процентом бластных клеток в костном мозге, например, таких как миелодиспластические синдромы (МДС).

Изучение механизмов развития МДС выявило, что их патогенетическая база предполагает возникновение и прогрессивное укрепление ано-

мальных клонов гемопоэтических клеток, которые замещают и подавляют нормальное кроветворение. При этом уровень поражения гемопоэза достаточно высокий, трансформация происходит на уровне полипотентной стволовой клетки, что в дальнейшем приводит к невозможности ее нормальной дифференцировки в зрелые клетки крови. Современные данные о патогенезе МДС позволяют предположить мозаичный характер кроветворения, когда гемопоэз представлен как генетически нестабильным клоном, так и нормальными кроветворными элементами [3].

Материалы и методы исследования

В связи с клинико-морфологическим полиморфизмом и относительно стабильным течением МДС большой интерес вызывает изучение механизмов и проявлений прогрессирования нестабильного клона, в первую очередь, участие иммунной системы в этом процессе. Известно, что уникальной особенностью бластных клеток при МДС является сохранение ими дифференцировочного статуса предшественников гемопоэза. Однако, в отличие от нормальной клеточной дифференцировки, при которой невелик процент клеток, коэкспрессирующих маркеры различных линий и стадий гемопоэза, при МДС и острых нелимфобластных лейкозах одновременная экспрессия в норме не встречающихся антигенов определяется почти в 85 % случаев [1]. То есть, лейкозный клон клеток, имеющий однородные морфоцитохимические характеристики, является

гетерогенным по антигенной структуре бластных элементов, что определяет перспективы их иммунофенотипического изучения.

В исследование включены данные 79 пациентов с различными вариантами МДС, находящихся в отделениях гематологии УЗ «9-я городская клиническая больница» и ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека». Возрастная структура представлена диапазоном от 18 до 59 лет (медиана возраста 40,6 лет). Распределение по полу имело равновеликий характер (40 женщин и 39 мужчин). Вариант заболевания установлен согласно критериев ВОЗ классификации миелоидных неоплазий [2], по которой в 13,9 % случаев диагностирована рефрактерная анемия (RA) как вариант рефрактерной цитопении с однолинейной дисплазией, в 31,7 % — рефрактерная цитопения с множественной дисплазией (RCMD), в 1,3 % — рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (RARS), в 46,8 % — рефрактерная анемия с избытком бластов (RAEB), в 2,5 % — 5q-синдром и в 3,8 % — хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML) как вариант миелодиспластических/миелопрлиферативных заболеваний.

Клинические проявления заболевания характеризовались анемическим, геморрагическим, пролиферативным и интоксикационным синдромами и отражали имеющиеся изменения в периферической крови. В дебюте заболевания у 89,8 % пациентов на первый план выступали симптомы, связанные с анемией. Инфекционные осложнения наблюдались с частотой 13,9 %. Геморрагический синдром при первичном обследовании диагностирован у 16,7 % пациентов. Органомегалия (лимфаденопатия, гепато- и спленомегалия) наблюдались у 35,1 %, преимущественно, при вариантах CMML и RAEB. В гемограмме анемия установлена в 100 % случаев, при этом макроцитоз отмечен у 91,1 %, гиперхромия — у 74,6 %. Изменения количества лейкоцитов имели 53,2 % пациентов с МДС. Лейкоцитоз ($43,9 \pm 13,1 \times 10^9/\text{л}$) у 20,2 % характеризовал варианты CMML и RAEB. Лейкопения диагностирована в 27,8 % ($1,7 \pm 0,13 \times 10^9/\text{л}$). Базофилия ($0,98 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$) отмечена в 7,6 % случаев, а нейтрофильный сдвиг влево до миелоцитов — в 36,7 %. Выход бластных клеток в периферическую кровь имели 22,8 % пациентов. Тромбоцитопения ($42,6 \pm 9,8 \times 10^9/\text{л}$) диагностирована в 67,1 % случаев. Количественный анализ костномозгового кроветворения по данным миелограммы показал, что гипопластическое состояние костного мозга отмечалось в 7,6 % случаев (количество миелокариоцитов — $27,3 \pm 11,5 \times 10^9/\text{л}$). Гиперпластический костный мозг характеризовал гемопоэз у 74,6 % пациентов (количество миелокариоцитов $412,2 \pm 78,6 \times 10^9/\text{л}$). Гиперплазия эритроидного

ростка установлена в 77,2 %, при этом признаки мегалобластоидного кроветворения костного мозга наблюдались в 100 % случаев. Кроме того, для 82,3 % была характерна задержка созревания эритроидных клеток на уровне полихроматофильных нормобластов. Количество мегакариоцитов снижено у 79,7 % пациентов с различными вариантами МДС. У 89,8 % страдающих первичным МДС имело место омоложение гранулоцитарного ростка.

Иммунологический фенотип бластных клеток определен с использованием широкой панели моноклональных антител, результаты учитывали методом проточной цитофлуориметрии, антиген — положительным считалось наличие экспрессии маркера на более чем 20 % клеток.

Результаты исследования

В результате проведенных исследований выявлена гетерогенность иммуноцитологического состава клеток костного мозга при МДС. В основном характеристика иммунофенотипа соответствовала таковой совершенных миелоидных предшественников (CD34+, HLA-DR+, CD13+, CD33+). При этом степень экспрессии миелоидных антигенов и антигенов ранних предшественников находилась в зависимости от варианта МДС. Так, маркер созревающих миелоидных клеток CD15 имел максимальное распространение при RA ($24,3 \pm 9,3$ %) и RCMD ($22,1 \pm 7,1$ %). Одновременно с этим при анализе в динамике определена прямая связь степени экспрессии CD15 со скоростью прогрессирования заболевания. Достоверно более высокий уровень экспрессии CD15 отмечен при медленно прогрессирующем МДС по сравнению с быстрой прогрессией и трансформацией в острый лейкоз в короткий срок. Антиген CD117, характеризующий незрелые клетки, имел максимально выраженную экспрессию при вариантах RAEB ($56,7 \pm 14,2$ %) и CMML ($51,3 \pm 9,1$ %). Маркер CD38 находился на 34–93 % ($62,4 \pm 11,0$) клеток КМ пациентов с вариантом RA, а CD3 экспрессировали $51,5 \pm 9,8$ % клеток при варианте RARS. Кроме того, с RARS вариантом связан и высокий уровень экспрессии CD71 на гранулоцитах. При 5q-синдроме (2 пациента) установлено $82,3 \pm 6,9$ % клеток, экспрессирующих CD45+CD14–.

Из всех вариантов МДС наиболее однородную группу по клеточному иммунофенотипу представляет собой RAEB. Этот вариант характеризуется возрастанием в костном мозге процента клеток с миелоидными антигенами, в первую очередь, CD33, а интенсивность их экспрессии приближается к показателям миелобластов, определенных в динамике при трансформации МДС в острый лейкоз.

Прогрессирование заболевания при всех вариантах МДС характеризовалось изменением фенотипа клеток КМ к более раннему — отме-

чена высокая интенсивность экспрессии антигенов миелоидной линии дифференцировки CD33, CD 13 и антигенов ранних кроветворных предшественников CD34+ и HLA-DR+. Так степень экспрессии CD34 и HLA-DR составила в среднем при вариантах RA/RARS — $16,2 \pm 8,4$ % и $31,0 \pm 7,9$ %, RCMD — $29,3 \pm 10,1$ % и $37,4 \pm 9,7$ %, RAEB — $46,2 \pm 9,1$ % и $48,9 \pm 12,3$ % соответственно. Антигены CD33 и CD13 имели $38,6 \pm 11,5$ % и $68,2 \pm 9,9$ % клеток при RA/RARS, $57,6 \pm 13,4$ % и $62,7 \pm 10,3$ % клеток при RCMD, $71,0 \pm 14,5$ % и $51,3 \pm 12,7$ % клеток при RAEB соответственно.

Заключение

Таким образом, при гетерогенности клеточной популяции у пациентов с МДС имму-

нофенотип клеток костного мозга обнаруживает высокое диагностическое и, возможно, прогностическое значение. Данный метод может служить инструментом для дифференциальной диагностики различных вариантов МДС.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Прогностическое значение иммунофенотипа злокачественных клеток (на примере острых нелимфобластных лейкозов) / И. Г. Маркина [и др.] // Рус. мед. журнал. — 2001. — Т. 9, № 22. — С. 1003–1008.
2. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview / R. D. Brunning [et al.] // In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / Ed. by S. H. Swerdlow [et al.] // Lyon: IARC. — 2008. — Vol. 2. — P. 88–93.
3. Stetler-Stevenson, M. Myelodysplastic syndromes: the role of flow cytometry in diagnosis and prognosis / M. Stetler-Stevenson, C. M. Yuan // International Journal of Laboratory Hematology. — 2009. — Vol. 31, № 5. — P. 479–483.

УДК 616.419-053.2-036.82

МЕДИЦИНСКАЯ РЕАБИЛИТАЦИЯ ДЕТЕЙ С МИЕЛОИДНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ

**Т. И. Козарезова¹, Н. Н. Климович¹, В. И. Лагунович-Черепко²,
Г. Н. Родионова², В. И. Смычек³, В. В. Голикова³**

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

²Республиканская детская больница медицинской реабилитации, г. Минск

³Научно-исследовательский институт медико-социальной экспертизы и реабилитации, г. Минск

На современном этапе развития детской гематологии параллельно с успехами терапии возникла проблема поздних эффектов лечения, проявляющихся в виде нарушения функционирования основных систем жизнедеятельности организма. В статье представлено обоснование создания специальных реабилитационных программ, учитывающих комплексный характер нарушений и обеспечивающих эффективную их коррекцию. Предложена качественно новая организация лечебно-реабилитационных мероприятий с широким использованием лечебных и психологических методов. Авторами проведен анализ структуры сопутствующих заболеваний у детей с миелоидными неоплазиями, что позволило наметить подходы к созданию системы медицинской реабилитации для этой группы детей. Дана характеристика различных видов реабилитационной терапии и их эффективности.

Ключевые слова: дети, миелоидные неоплазии, медицинская реабилитация.

MEDICAL REHABILITATION OF CHILDREN WITH MYELOID NEOPLASMS

**T. I. Kozarezova¹, N. N. Klimkovich¹, V. I. Lagunovich-Cherepko²,
G. N. Rodionova², V. I. Smychek³, V. V. Golikova³**

¹Belarussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk

²Republican Children`s Hospital for Medical Rehabilitation, Minsk

³Research Institute of Medical Social Expertise and Rehabilitation, Minsk

At the present stage of the development of pediatric hematology along with the success of the therapy there is a problem of late treatment effects which reveal itself in functioning disturbances of the main systems of the organism vital activity. The article presents the substantiation of the creation of special rehabilitation programs which take into consideration the complex character of the disturbances and ensure their effective correction.

A qualitatively new organization of rehabilitation activities with the wide use of treatment-and-psychological methods has been proposed. The authors analyzed the structure of the concomitant diseases in the children suffering from myeloid neoplasms, which made it possible to outline the approaches to the creation of a medical rehabilitation system for this group of children. The description of different types of the rehabilitation therapy and their efficacy was given.

Key words: children, myeloid neoplasms, medical rehabilitation.

В структуре болезней детского возраста онкологические заболевания из клеток крови занимают одно из первых мест. Сегодня количе-

ство пациентов с онкопатологией возрастает, что обусловлено не только первичными случаями болезни, но и увеличением продолжи-

тельности ремиссии болезни в результате внедрения новых технологий в процесс терапии. Однако стойкость и сложность нарушений функционирования различных органов и систем после проведения массивной полихимиотерапии, лучевой терапии, различные типы осложнений лечения, безусловно, оказывают негативное действие на качество жизни пациентов. В связи с этим медико-социальная забота является важной и незаменимой задачей для пациентов с опухолевыми болезнями крови. На первое место при выходе в ремиссию выступают осложнения этих заболеваний и проводимой терапии: гепатиты (вирусные и токсические), кардиомиопатии, панкреатиты, инфекционно-воспалительные процессы, остеопорозы и т. п. На наш взгляд, своевременность и правильность проведения реабилитационных мероприятий, разработка медико-социальной индивидуальной комплексной программы и критериев эффективности реабилитации позволят снизить инвалидизацию, повысить эффективность лечебной помощи, обеспечить психологическую защиту, профориентацию и адаптацию, и, следовательно, улучшить качество жизни. На современном этапе развития медицины реабилитация из разрозненных отдельных методик и способов приобрела стройную систему научных положений, которые реализуются в практике различных реабилитационных отделений. В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных отдельным методам реабилитации детей с онкогематологической патологией [1, 2]. Однако отсутствуют данные о комплексной системной реабилитации детей с миелоидными неоплазиями. Настоящее исследование имеет своей целью создание научно-обоснованной системы медицинской реабилитации пациентов с миелоидными неоплазиями. В нем обобщен опыт совместной работы сотрудников УЗ «Республиканская детская больница медицинской реабилитации», кафедры детской онкологии и гематологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» и ГУ «НИИ медико-социальной экспертизы и реабилитации».

Известно, что система медицинской реабилитации включает несколько этапов (стационарный, поликлинический, санаторный), где цель, задачи и методы реабилитации устанавливаются

в зависимости от этапа ее проведения, возраста пациента, нозологической формы и степени ограничения жизнедеятельности. Медицинская реабилитация детей с миелоидными неоплазиями предполагает последовательное осуществление следующих мероприятий: медикаментозная терапия, диетотерапия, физиотерапевтические и физические меры воздействия, психотерапия, обеспечение ребенка-инвалида техническими средствами, социальная реабилитация, обучение и профориентация.

Материалы и методы исследования

Настоящее исследование включало динамическое клиничко-лабораторное обследование детей с миелоидными неоплазиями в УЗ «Республиканская детская больница медицинской реабилитации». Показаниями к направлению для медицинской реабилитации являлась необходимость преодоления последствий основного заболевания, восстановление нарушенных функций и улучшение качества жизни пациента. Противопоказаниями к направлению детей для проведения медицинской реабилитации являлись острый период основного заболевания или его рецидива, острые осложнения полихимо- и лучевой терапии, требующие стационарного лечения, наличие острых инфекционных заболеваний, сопутствующие заболевания с тяжелыми расстройствами органов и систем, требующими специального обслуживания или пребывания в специализированном стационаре. В течение четырехлетнего периода (2007–2010 гг.) в рамках стационарного этапа медицинской реабилитации на базе онкологического отделения реабилитации УЗ «Республиканская детская больница медицинской реабилитации» находились 57 детей (32 мальчика и 25 девочек) с миелоидными неоплазиями в возрасте от 7 до 18 лет (медиана возраста — 11,6 лет) со всех регионов Республики Беларусь. Структура пациентов с миелоидными неоплазиями в зависимости от нозологической формы была неоднородна: 50 детей имели различные типы острых миелобластных лейкозов (ОМЛ), 3 ребенка — миелодиспластические синдромы (МДС), 1 — хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) и 4 — хронический миелолейкоз (ХМЛ) (таблица 1).

Таблица 1 — Распределение пациентов в зависимости от нозологической формы и периода наблюдения

Нозологическая форма	Количество пациентов по годам наблюдения				Общее количество пациентов
	2007 г.	2008 г.	2009 г.	2010 г.	
ОМЛ	16 (28,0 %)	12 (21,1 %)	13 (22,8 %)	9 (15,8 %)	50 (87,7 %)
МДС/ХММЛ	1 (1,75 %)	1 (1,75 %)	1 (1,75 %)	—	3 (5,3 %)
ХМЛ	1 (1,75 %)	1 (1,75 %)	2 (3,5 %)	—	4 (7,0 %)

Все пациенты в период проведения стационарного этапа медицинской реабилитации на-

ходились после завершения специфической терапии, из них 4 ребенка после трансплантации

гемопоэтическими стволовыми клетками, и имели ремиссию по основному заболеванию. В период наблюдения рецидив болезни диагностирован у одного ребенка.

Результаты исследования

Анализ структуры основных нарушений, обуславливающих ограничение жизнедеятельности детей с миелоидными неоплазиями установил преобладание патологии гепатобилиарной системы — 35 %, органов дыхания и ЛОР-органов — 32 %, сердечно-сосудистой системы — 17,5 %, эндокринной системы — 10,5 %. На долю заболеваний желудочно-кишечного тракта пришлось 8,8 %, опорно-двигательного аппарата — 5,3 %.

На основании вышеизложенного был определен алгоритм первичного обследования детей для каждой нозологической единицы, включающий гематологические, иммунологические, функциональные, инструментальные и психологические методы для определения потенциальных восстановительных способностей и реабилитационных программ на основании базовых принципов (комплексность, непрерывность, последовательность и преемственность) с условием индивидуальной коррекции. За анализируемый период все наблюдаемые дети с миелоидными неоплазиями получили следующие виды реабилитационных мероприятий:

— дифференцированная медикаментозная терапия в зависимости от выявленных нарушений: постоянная, поддерживающая и курсовая (витаминотерапия, фитотерапия, мембраностабилизирующие средства, санация очагов хронической инфекции, заместительная терапия, ангиопротекторы и т. д.) — 100 %;

— мероприятия физической реабилитации: лечебная гимнастика групповая и индивидуальная — 47,4 и 56,1 % соответственно, гидрокинезотерапия — 82,4 %, механотерапия — 63,2 %, массаж — 85,9 %;

— физиотерапевтические мероприятия: оксигенотерапия — 100 %, ингаляции — 50,8 %, водолечение — 59,6 %;

— психологические мероприятия (выработка установки на активное участие в реабилитационном процессе, индивидуальная и групповая психотерапия, игра, эстетическая и музыкально-художественная терапия, лечебная

хореография и педагогика, социально-психологический тренинг) — 100 %.

Эффективность проведенных реабилитационных мероприятий, как правило, характеризовалась уменьшением проявления психопатических реакций, повышением эмоционального тонуса, нормализацией сна, улучшением или нормализацией параметров массы тела, исчезновением или значительным уменьшением клинических проявлений активности токсического гепатита, кардиомиопатии, эндокринных нарушений, поражения желудочно-кишечного тракта и опорно-двигательного аппарата, а также отсутствием случаев прогрессирования основного заболевания. Кроме того, выделен целый ряд лабораторных и инструментальных показателей, которые имели тенденцию к нормализации после курса реабилитационных мероприятий. Так, например, достоверное снижение активности АЛТ и АСТ у детей с токсическими и вирусными гепатитами установлено в 50,8 % случаев, нормализация показателей общего билирубина — 36,8 %, улучшение сократительной способности миокарда по данным УЗИ сердца — 31,5 %, улучшение психологического статуса — 91,2 %.

Заключение

Проведенные исследования состояния пациентов с миелоидными неоплазиями на этапе медицинской реабилитации позволили установить, что своевременность и правильность проведения реабилитационных мероприятий, разработка медико-социальной индивидуальной комплексной программы и критериев эффективности реабилитации позволят повысить эффективность лечебной помощи, обеспечить психологическую защиту и адаптацию. Это является предпосылкой для разработки технологии медицинской реабилитации при опухолевых болезнях крови, что в итоге позволит снизить степень инвалидизации, а, следовательно, улучшить качество жизни детей с данной патологией.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Quality of life in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in remission / O. Geludkova [et al.] // Medical and pediatric oncology. — 2001. — Vol. 37, № 3. — P. 250.
2. Oncology Rehabilitation Program at the Ottawa Regional Cancer Centre: program description / R. Segal [et al.] // Journal Canadian Medical Association. — 1999. — Vol. 161. — P. 282–285.

УДК 616-053.31+616-002.151

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Е. Л. Козлова¹, Н. Н. Климович²

¹Родильный дом Минской области, г. Минск

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

Проблема нарушений гемостаза в неонатологии имеет особую актуальность в связи с ее физиологической нестабильностью, усугубляющейся под влиянием разнообразных патологических процессов. На основании литературных данных в статье систематизированы причины, приводящие к нарушению функционирования гемостаза в

неонатальный период и охарактеризованы факторы риска геморрагических осложнений со стороны новорожденно-го и матери. Показано, что состояние микроциркуляторного гемостаза у новорожденных требует детального изучения, поскольку полученные знания о функционировании первичного звена гемостаза позволят решить многие важные вопросы, касающиеся коррекции нарушений при геморрагическом синдроме у новорожденных.

Ключевые слова: система гемостаза, новорожденные, геморрагический синдром.

RISK FACTORS FOR THE DEVELOPMENT OF HEMORRHAGIC SYNDROME IN NEONATAL PERIOD

E. L. Kozlova¹, N. N. Klimkovich²

¹Maternity home of Minsk region, Minsk

²Belarusian Academy for Postgraduate Education, Minsk

The problem of hemostasis disturbances in neonatology gains currency due to its physiological instability aggravated by various pathologic processes. Based on literary data, the article systematizes the causes that lead to the disturbance of hemostasis functioning in the neonatal period and characterizes the risk factors for hemorrhagic complications from the neonate and the mother.

It has been shown that the state of microcirculatory hemostasis in the neonates demands its detailed investigation, as the received knowledge about the functioning of primary hemostasis will make it possible to decide a lot of important issues that relate to the disturbance correction in hemorrhagic syndrome in the neonates.

Key words: hemostasis system, neonates, hemorrhagic syndrome

Проблема нарушений гемостаза в неонатологии приобретает особую актуальность, поскольку имеет место физиологическая нестабильность данной системы, усугубляющаяся под влиянием разнообразных патологических процессов. Именно нарушения звеньев гемостаза могут нередко определять летальный исход у пациента при различных инфекциях, врожденных пороках развития органов и систем и т. п. [5]. Известно, что значительная частота геморрагических расстройств в периоде новорожденности обусловлена тем, что система гемостаза претерпевает бурные и значительные изменения, которые требуют дальнейшей оценки взаимосвязи с условиями внутриутробного статуса, перенесенного родового стресса, состояния преморбидного фона матери и гестационного возраста пациента. При этом многие проблемы также связаны с техническими трудностями, в частности, получением необходимого количества венозной крови у новорожденных для проведения лабораторного исследования, отсутствие до недавнего времени нормативных показателей неонатального гемостаза, полученных с помощью унифицированной системы микротестов [4].

Ранее было установлено, что основной клинической особенностью состояния свертывающей системы крови новорожденного является тенденция к более частому возникновению разнонаправленных нарушений. Чем более «незрелым» родился ребенок, тем выше у него риск развития геморрагических осложнений. Все вышеизложенное может свидетельствовать об ограничении возможностей исследования системы гемостаза новорожденных рядом факторов, а именно: небольшим объемом исследуемой периферической крови, быстрым динами-

ческим изменением возрастных нормативов гемостазиологических тестов, различием и нестабильностью контрольных цифр в зависимости от аппаратного обеспечения и исследуемой крови (периферическая и пуповинная). В настоящее время работ, посвященных исследованию как первичного, так и вторичного гемостаза в ранний неонатальный период немного. Данные по этому вопросу нередко противоречивы, исследования проведены на небольшом клиническом материале с ограничением использования гемостазиологических тестов. Это связано с тем, что система гемостаза в неонатальном периоде постоянно претерпевает количественные и качественные изменения, и ее оценка с использованием возрастных референтных интервалов затруднена [2].

В клинической практике неонатологов огромное значение придается наличию геморрагического синдрома, характеризующегося нарушением первичного и/или вторичного гемостаза. Как правило, геморрагические проявления обусловлены повышенной проницаемостью сосудистой стенки или нарушением функционально-количественного состава тромбоцитов. Это может быть связано как с врожденной или наследственной патологией, так и иметь приобретенный характер. Частота развития неонатальной тромбоцитопении по данным различных авторов составляет 1:5000 новорожденных, внутричерепных кровоизлияний — 10–20 %, причем половина из них происходит внутриутробно на фоне инфицирования плода при цитомегаловирусной и герпетической инфекциях, сифилисе, токсоплазмозе, краснухе. На основании литературных данных нами систематизированы

причины, приводящие к нарушению функционирования гемостаза в неонатальный период.

Факторы риска геморрагических осложнений со стороны новорожденного подразделяются на первичные и вторичные. Первичные факторы включают количественное и качественное нарушение тромбоцитов, дефицит факторов свертывания крови, недостаточность белково-синтетической функции печени, пороки развития сосудов.

Развитие геморрагического синдрома при тромбоцитопениях и тромбоцитопатиях обусловлено, преимущественно, нарушением ангиотрофической функции тромбоцитов, что ведет к изменению сосудистого эндотелия и к возникновению спонтанных геморрагий и кровотечениям из микроциркуляторного русла. Известно, что для поддержания трофики сосудов достаточно всего лишь 20–25 % тромбоцитов от числа циркулирующих в периферической крови. Именно количества $30\text{--}50 \times 10^9/\text{л}$ кровяных пластинок достаточно для поддержания эффективного гемостаза. Наряду с нарушением ангиотрофической функции тромбоцитов имеет место недостаточность белково-синтетической функции печени, что ведет к дефициту факторов свертывания крови (в частности, протромбинового комплекса), антитромбина и фибриногена [3].

Вторичные (приобретенные) факторы включают недоношенность, задержку внутриутробного развития, гипоксию (пери- и постнатальную), нарушение обмена веществ, внутриутробную инфекцию, тяжелую гемолитическую болезнь, позднее прикладывание к груди и искусственное вскармливание. Так, у недоношенных детей, детей с задержкой внутриутробного развития, у детей на фоне хронической гипоксии при рождении выявляются еще более низкие величины активности как прокоагулянтов, так и антикоагулянтов, факторов контакта. Но при этом более активный фибринолиз при низком уровне плазминогена, а также агрегационной активности тромбоцитов, большой проницаемости и хрупкости сосудистой стенки.

Гипоксия, которая обычно сопровождается ацидозом и снижением периферической перфузии, приводит к развитию ДВС-синдрома путем высвобождения тканевого фактора из поврежденных лейкоцитов и клеток эндотелия. Этот механизм играет в данном случае более важную роль, чем нарушение тромбоцитарного звена гемостаза.

Развитие геморрагического синдрома при инфекциях обусловлено рядом факторов: повышенным разрушением тромбоцитов инфекционными агентами, повышенной адгезией тромбоцитов к эндотелию из-за повреждения последнего, сниженной продукцией тромбоцитов, ретикулоэндотелиальной гиперплазией с секвестрацией, угнетением мегакариоцитарного ростка костного мозга, гиперспленизмом.

К материнским факторам относят фетальную трансфузию, предлежание плаценты, HELLP-синдром, EPH-гестоз, применяемые лекарственные препараты (антиревматические, противосудорожные, антикоагулянты), аутоиммунную тромбоцитопению у матери. Основными этапами развития HELLP-синдрома при тяжелой форме гестоза считают аутоиммунное повреждение эндотелия, гиповолемию со сгущением крови и образование микротромбов с последующим фибринолизом. Одним из основных лабораторных симптомов HELLP-синдрома служит гемолиз, который лабораторно характеризуется наличием в мазке крови сморщенных и деформированных эритроцитов, полихромазией. Разрушение эритроцитов ведет к высвобождению фосфолипидов и к внутрисосудистому свертыванию, т. е. хроническому ДВС-синдрому, который бывает причиной смертельных акушерских кровотечений. При EPH-гестозе отмечается патологическая активация фактора Виллебранда как маркера повреждения сосудов. Исследование гемостазиологических показателей у новорожденных от матерей с поздним гестозом выявило высокий уровень растворимых фибрин мономерных комплексов в плазме, высокую степень поражения эндотелия сосудов, сопровождающегося высвобождением фактора Виллебранда, четко коррелирующего со степенью поражения сосудов матери, признаками угнетения активности прокоагулянтов [1].

Данные о состоянии сосудисто-тромбоцитарного гемостаза в ранний неонатальный период противоречивы. Одни авторы выявили функциональные особенности сосудисто-тромбоцитарного гемостаза в ранний неонатальный период у доношенных новорожденных, характеризующиеся нормальным количеством тромбоцитов, снижением адгезивной активности тромбоцитов их способности к агрегации, при этом увеличением на 3–4-е сутки функциональной активности как адгезии, так и агрегации тромбоцитов. Другими учеными установлено снижение количества тромбоцитов сразу после рождения, сопровождающееся повышением уровня тромбоксана В, β -тромбоглобулина и тромбоцитарного фактора в крови пациентов. При этом все исследователи отмечают повышенную проницаемость и хрупкость сосудистой стенки в ранний неонатальный период [4].

Заключение

Таким образом, на основании представленного материала можно с уверенностью констатировать, что состояние микроциркуляторного гемостаза у новорожденных требует детального изучения. Полученные знания о функционировании первичного звена гемостаза позволят решить многие важные вопросы, касающиеся коррекции нарушений при геморрагическом синдроме у новорожденных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дмитриев, В. В. Практическая коагулогия / В. В. Дмитриев. — Минск: Бел. наука, 2004. — 544 с.
2. Оценка нарушений гемостаза у недоношенных новорожденных / Г. Н. Кузьменко [и др.] // Рос. педиатр. журн. — 2009. — № 5. — С. 4–8.

3. Третьякова, О. С. Современные подходы к диагностике и лечению тромбоцитопений новорожденных / О. С. Третьякова // Здоровье ребенка. — 2006. — № 1. — С. 41–44.

4. Чупрова, А. В. Система неонатального гемостаза в норме и при патологии / А. В. Чупрова // Бюлл. РАМН. — 2005. — № 4. — С. 13–19.

5. Hematologic Problems of the Neonate / R. J. Hutchinson [et al.]. — Philadelphia, 2000. — 453 p.

УДК 616.155.3-002

**РАСТВОРИМАЯ ФОРМА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 CXCR2
В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА ВОВЛЕЧЕНИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ЛОКАЛЬНЫЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС**

**Ю. В. Котлинская¹, К. В. Котлинский¹, С. Т. Акалович²,
А. В. Воробей³, Ю. Н. Орловский³, Т. М. Дорошенко⁴**

¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

³Республиканский центр реконструктивной хирургической гастроэнтерологии,
колопроктологии и лазерной хирургии, г. Минск

⁴Минская областная клиническая больница, г. Минск

Снижение уровня экспрессии хемотактического рецептора CXCR2 при активации нейтрофилов сопровождается появлением растворимого CXCR2 (pCXCR2) в клеточном супернатанте. В настоящей работе в перитонеальной жидкости больных с острым перитонитом и смывах из брюшной полости больных при диагностической лапароскопией по поводу заболеваний, не связанных с воспалением органов брюшной полости (контрольная группа), исследовано содержание pCXCR2, интерлейкина-6 (ИЛ-6) и α -дефензинов (human neutrophil peptides, HNP). Было показано, что уровень pCXCR2, HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости в остром послеоперационном периоде болезни достоверно повышен по сравнению с контрольной группой. Была выявлена положительная корреляция pCXCR2 с HNP ($r = 0,72$, $p < 0,001$) и ИЛ-6 ($r = 0,64$, $p < 0,05$) в перитонеальной жидкости больных и смывах из брюшной полости пациентов контрольной группы. Мы предполагаем, что определение pCXCR2 в перитонеальной жидкости наряду с ИЛ-6 и HNP, может служить дополнительным диагностическим инструментом раннего распознавания интраабдоминальных осложнений перитонита.

Ключевые слова: растворимый рецептор интерлейкина-8 CXCR2, нейтрофилы, острый перитонит, интерлейкин-6, α -дефензины.

**SOLUBLE FORM OF INTERLEUKIN-8 CXCR2 RECEPTOR
AS A MARKER OF THE LOCAL INFLAMMATORY INVOLVEMENT
OF THE HUMAN BLOOD NEUTROPHIL LEUKOCYTES**

**Yu. V. Kotlinskaya¹, K. V. Kotlinskiy¹, S. T. Akalovich²,
A. V. Vorobei³, Yu. N. Orlovskiy³, T. M. Doroshenko⁴**

¹Republican Research Centre for Hematology and Transfusiology, Minsk

²Belarussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk

³Republican Centre for Reconstructive Surgical Gastroenterology,
Coloproctology and Laser Surgery, Minsk

⁴Minsk Regional Clinical Hospital

The decreased level of the chemotactical receptor CXCR2 expression is accompanied by the emergence of soluble CXCR2 (pCXCR2) in cellular supernatant in neutrophil activation. The content of pCXCR2, interleukin-6 (IL-6) and α -defenzins (human neutrophil peptides, HNP) has been studied in the peritoneal fluid of patients with acute peritonitis and lavages from abdominal cavity in diagnostic laparoscopy for the diseases that are not related to the abdominal organ inflammation (control group). It was shown that the levels of pCXCR2, HNP and IL-6 in the peritoneal fluid were reliably higher in the comparison with the level of the control group in the acute postoperative period of the disease. The positive correlation between pCXCR2 and HNP ($r = 0,72$, $p < 0,001$) and IL-6 ($r = 0,64$, $p < 0,05$) was detected in the peritoneal fluid of the patients and the lavages from the abdominal cavity of the patients of the control group. We assume that the detection of pCXCR2 in the peritoneal fluid alongside with IL-6 and HNP can serve as an additional diagnostic tool for the early recognition of intra-abdominal peritonitis complications.

Key words: soluble interleukin-8 CXCR2 receptor, neutrophils, acute peritonitis, interleukin-6, α -defenzins.

Введение

Полиморфноядерные нейтрофилы (ПМН) крови играют центральную роль в антибактериальной защите организма. Антибактериальная функция ПМН связана с их миграцией из кровотока в ткани под действием специализированных хемотаксических белков. Интерлейкин-8 (ИЛ-8) является основным хемотаксическим цитокином для ПМН при воспалении. ИЛ-8 действует на клетки через мембранные рецепторы первого (CXCR1) и второго (CXCR2) типов [5]. CXCR2 отвечает за хемотаксис, а CXCR1 за проявление микробицидной активности ПМН [12]. Нами было впервые показано, что снижение уровня экспрессии хемотаксического рецептора ИЛ-8 CXCR2 на поверхности нейтрофилов при фагоцитозе микроорганизмов, под действием фактора некроза опухолей α (ФНО) или липополисахарида сопровождается появлением растворимого CXCR2 (pCXCR2) в супернатанте активированных клеток [1, 2, 4]. Открытие этого явления позволило предположить, что pCXCR2 может служить в качестве маркера падения экспрессии CXCR2 на нейтрофилах *in vitro* и *in vivo*, т. е. маркером их дисфункции при различных патологических и физиологических процессах.

В наших предыдущих исследованиях в качестве модели локального воспалительного процесса, ведущую роль в котором играют ПМН, мы использовали острую фазу послеоперационного перитонита с последующим выздоровлением. Проведенный нами анализ перитонеального экссудата больных с острым послеоперационным перитонитом позволил выявить высокий уровень pCXCR2 в острой фазе заболевания и статистически значимое его снижение при выздоровлении [1].

По сравнению с уровнями цитокинов в плазме, их уровень в перитонеальной жидкости существенно повышается после обширных хирургических операций на органах брюшной полости, что может служить действенным методом для контроля развития послеоперационной воспалительной реакции. После хирургических вмешательств повышение уровня таких цитокинов как ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО в перитонеальной жидкости может свидетельствовать о тяжелых интраабдоминальных осложнениях [9]. В исследовании Yamamoto и соавт. [14] показано, что уровень ИЛ-6, одного из важнейших медиаторов острой фазы воспаления, в перитонеальной жидкости больных, подвергшихся операции на органах брюшной полости, положительно коррелирует с длительностью операции и кровопотерей во время операции, что согласуется с ранее полученными данными [13]. Таким образом, на послеоперационный уровень перитонеальных цитокинов значительное влияние оказывает степень хирургического стресса.

Нейтрофилы участвуют в воспалительных реакциях не только как фагоциты, но и как

клетки, выделяющие микробицидные факторы (эластаза, катепсин G, азуроцидин и др.). Важнейшим микробицидным агентом нейтрофилов являются небольшие катионные белки α -дефензины (human neutrophil peptides, HNP) с широким спектром антибактериальной активности [8]. Высокий уровень дефензинов обнаружен в перитонеальной жидкости при остром локальном воспалении [7].

Цель исследования

Оценка уровней растворимого CXCR2 в комплексе с ИЛ-6 и HNP, а также поиск их возможной взаимосвязи при локальном воспалительном процессе у больных с острым перитонитом по сравнению с группой пациентов, подвергшихся диагностической лапароскопии.

Материалы и методы исследования

В работе использованы перитонеальная жидкость больных с острым перитонитом и смывы из брюшной полости больных при диагностической лапароскопии по поводу заболеваний, не связанных с воспалением органов брюшной полости, госпитализированных в УЗ «Минская областная клиническая больница» в 2010–2011 гг. В 1-ю группу вошли пациенты, у которых перитонит возник после полостного оперативного вмешательства в кишечнике (послеоперационный перитонит). Возраст пациентов (8 мужчин и 2 женщины) на момент сбора образцов в среднем составил 55,4 года (от 30 до 78 лет). Взятие образцов осуществлялось в ранний послеоперационный период (1–2-е сутки после операции). Во 2 (контрольную) группу объединены 8 пациентов, подвергшихся диагностической лапароскопии. При заборе клинического материала у всех участников данного исследования получено информированное согласие. После сбора образцы центрифугировали (400 g) и хранили при -20°C .

Содержание pCXCR2 и HNP определяли ранее разработанными в нашей лаборатории твердофазными иммуноферментными методами [2, 11]. Исследование ИЛ-6 проводили с помощью набора реактивов «ИФА-ИЛ-6» (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург). Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica» 6.0. Зависимость между группами определяли с помощью корреляционного коэффициента (r) и коэффициента Спирмена (R). Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование концентрации pCXCR2, HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости в остром послеоперационном периоде болезни позволило выявить достоверное повышение уровня всех факторов по сравнению с контрольной группой (таблица 1). Повышение уровня HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости ранее описано и кор-

релирует с тяжестью состояния, выраженностью симптомов системного воспалительного ответа и может использоваться в качестве до-

полнительного прогностического критерия частоты возникновения послеоперационных осложнений [9, 13, 14].

Таблица 1 — Содержание рСХСR2, ИЛ-6 и HNP в перитонеальной жидкости больных острым послеоперационным перитонитом (1-я группа) и смывах больных, подвергшихся диагностической лапароскопии (2-я группа)

Группы пациентов	Уровень факторов (среднее значение ± SEM)		
	рСХСR2 (нг/мл)	ИЛ-6 (нг/мл)	HNP (мкг/мл)
1-я группа	9,24 ± 1,16*	72,76 ± 18,38*	48,68 ± 8,6*
2-я группа	0,12 ± 0,05	0,83 ± 0,49	3,35 ± 3,12

Примечание: * Достоверность различий между 1-й и 2-й группой.

При проведении корреляционного анализа содержания рСХСR2 с HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости больных и смывах из брюшной полости пациентов контрольной группы

была выявлена положительная корреляция с обоими факторами (R = 0,84, p < 0,001; r = 0,72, p < 0,001) и (R = 0,91, p < 0,001; r = 0,64, p < 0,05), соответственно (рисунок 1).

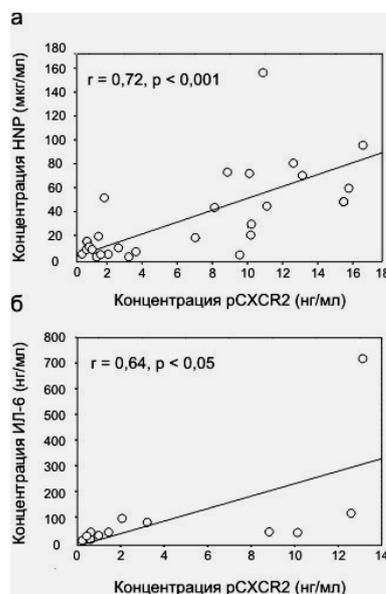


Рисунок 1 — Результат корреляционного анализа между рСХСR2 и HNP (а), между рСХСR2 и ИЛ-6 (б)

Ранее нами было показано, что анионный гликозилированный рСХСR2 стимулирует синтез тотального иммуноглобулина в культуре периферических мононуклеарных клеток крови человека *in vitro* [3]. Мы предположили, что рСХСR2 способен стимулировать выделение моноцитарных факторов, усиливающих синтез иммуноглобулинов В-лимфоцитами, например, ИЛ-6 [3]. Наличие корреляции между рСХСR2 и ИЛ-6 подтверждает ранее выдвинутую нами гипотезу о проявлении биологической активности растворимым СХСR2 в месте локального воспаления *in vivo*. Таким образом, рСХСR2 может служить новым гранулоцитарным фак-

тором, модулирующим активность мононуклеарных клеток при развитии воспалительной реакции в ответ на проникновение патогенных микроорганизмов, в которой принимают участие нейтрофилы, моноциты и В-лимфоциты.

Известно, что уровень HNP в плазме и других биологических жидкостях пациентов с воспалительными заболеваниями значительно повышен по сравнению со здоровыми донорами [10]. HNP высвобождаются во внеклеточное пространство в результате дегрануляции нейтрофилов, гибели клеток или их лизиса при воспалении [6]. Ранее нами было показано, что высокий плазменный уровень HNP и ИЛ-8, ос-

нового лиганда для CXCR2, коррелировал с неблагоприятным прогнозом и летальностью в группе критически больных пациентов с системным воспалительным ответом. Наличие тесной положительной корреляции между pCXCR2 и HNP, являющихся маркером активации нейтрофилов, свидетельствует о лейкоцитарном происхождении pCXCR2 в локальном участке воспаления, поскольку именно на ПМН экспрессируется наибольшее количество рецепторов CXCR2, которые при активации нейтрофилов ФНО, липополисахаридом или фагоцитарными стимулами протеолитически отщепляются с поверхности клеток и переходят в растворимую форму. Мы предполагаем, что в сайте воспаления могли бы формироваться комплексы анионного pCXCR2 с катионными HNP, модулируя эффекты друг друга.

Заключение

Таким образом, pCXCR2, образующийся в месте воспаления может участвовать в защит-

ных иммунных реакциях *in vivo*. В нашем исследовании у двух умерших пациентов, повторно оперированных из-за развившихся хирургических осложнений и исключенных из исследования, высокое содержание HNP в перитонеальной жидкости (95,01 и 34,06 мкг/мл) сопровождалось низкой концентрацией pCXCR2 (0,29 и 0,12 нг/мл), соответственно. Это может свидетельствовать о большом количестве функционально неактивных нейтрофилов, обусловленном массовой гибелью клеток под действием бактериальных продуктов и медиаторов воспаления, которая сопровождалась нарушением отщепления CXCR2 с поверхности ПМН.

Мы предполагаем, что определение pCXCR2 в перитонеальной жидкости наряду с ИЛ-6 и HNP, может служить дополнительным диагностическим инструментом раннего распознавания интраабдоминальных осложнений перитонита.

УДК 612.112.95

СТИМУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В КУЛЬТУРЕ МОНОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 CXCR2

К. В. Котлинский¹, Ю. В. Котлинская¹, Н. Н. Войтенко²

¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск

²Фонд развития молекулярной гематологии и иммунологии, г. Москва

Интерлейкин-8 (ИЛ-8) является основным хемотактическим фактором для полиморфноядерных нейтрофилов (ПМН) при воспалении. Ранее нами было показано, что стимуляция ПМН *in vitro* вызывает резкое снижение экспрессии рецептора ИЛ-8 второго типа CXCR2 на мембране ПМН и появление растворимого гликопептида CXCR2 (pCXCR2) в супернатанте. В данной работе мы изучили влияние pCXCR2 на синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и бронхоэпителиальных клеток человека A549. Было показано, что pCXCR2 достоверно стимулировал синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов с выраженным дозозависимым эффектом. В культуре бронхоэпителиальных клеток человека A549 pCXCR2 не вызывал синтеза ИЛ-8. Действие pCXCR2 на моноциты не было связано с загрязнением препарата липополисахаридом и было обусловлено наличием как белковой, так и углеводными частями в составе молекулы pCXCR2.

Ключевые слова: растворимый рецептор интерлейкина-8 CXCR2, моноциты крови человека, бронхоэпителиальные клетки человека A549, интерлейкин-8

STIMULATION OF INTERLEUKIN-8 SYNTHESIS IN MONOCYTE CULTURE UNDER SOLUBLE INTERLEUKIN-8 CXCR2 RECEPTOR

K. V. Kotlinskiy¹, Yu. V. Kotlinskaya¹, N. N. Voitenok²

¹Republican Research Centre for Hematology and Transfusiology, Minsk

²Fund for Molecular Hematology and Immunology, Moscow

Interleukin-8 (IL-8) is the main chemotactical factor for polymorphonuclear neutrophils (PMN) in inflammation. We have already shown that PMN stimulation *in vitro* causes a sharp decrease of IL-8 receptor expression of second type CXCR2 on the PMN membrane and an emergence of soluble glycopeptide CXCR2 (pCXCR2) in the supernatant. In this work we have studied the effect of pCXCR2 on IL-8 synthesis in the monocyte culture of the blood and bronchoepithelial human cells A549. It was shown that pCXCR2 reliably stimulated IL-8 synthesis in the monocyte culture with the evident dose-dependent effect. pCXCR2 did not cause IL-8 synthesis in the culture of the bronchoepithelial human cells A549. The influence of pCXCR2 on the monocytes was not related to the lipopolysaccharide contamination of the preparation and was caused by the protein and carbohydrate parts, included in pCXCR2 molecule.

Key words: soluble receptor of interleukin-8 CXCR2, human blood monocytes, bronchoepithelial human cells A549, interleukin-8.

Введение

Интерлейкин-8 (ИЛ-8/CXCL8), белок с молекулярной массой 8,3 кДа, является основным хемотактическим фактором, вызывающим миграцию ПМН крови в ткани при воспалении [7]. Нейтрализация ИЛ-8 антителами *in vivo* приводит к подавлению миграции ПМН в очаг воспаления [9]. Свое действие ИЛ-8 оказывает через два мембранных рецептора, CXCR1 и CXCR2, которые активируют каскад внутриклеточных реакций, приводящих к хемотаксису и активации ПМН [7].

В наших предыдущих исследованиях было впервые показано, что снижение уровня экспрессии CXCR2 на поверхности нейтрофилов *in vitro* при фагоцитозе микроорганизмов, под действием фактора некроза опухолей α (ФНО) или липополисахарида (ЛПС) происходит путем протеолитического отщепления N-концевого внеклеточного фрагмента CXCR2 и сопровождается появлением растворимого CXCR2 (pCXCR2) [1, 3, 4]. По данным гель-проникающей хроматографии pCXCR2 имеет молекулярную массу 35–40 кДа [4]. Анализ растворимого рецептора с помощью электрофореза в денатурирующих условиях показал, что молекулярная масса растворимого рецептора составляет 14–17 кДа [4]. Показано, что pCXCR2 N-гликозилирован, имеет самую низкую изоэлектрическую точку среди всех известных цитокинов и растворимых цитокиновых рецепторов (pI 3,2), может накапливаться в местах воспаления *in vivo* и всегда выявляется в моче здоровых лиц и больных с различной патологией [4, 1]. Физико-химические свойства растворимого CXCR2, экскретируемого с мочой, идентичны свойствам pCXCR2 из супернатанта активированных нейтрофилов [1].

Известно, что биологически активные молекулы, обладающие сходными с pCXCR2 физико-химическими свойствами — низким значением изоэлектрической точки, а также имеющие в своем составе углеводные остатки (полирибонуклеиновые кислоты, ЛПС клеточной стенки грам-отрицательных бактерий и др.), способны стимулировать моноциты крови человека [6, 10]. При воспалительных процессах моноциты крови и тканевые макрофаги играют центральную роль в развитии защитной воспалительной реакции, продуцируя различные цитокины, в т. ч. ИЛ-8, ФНО, ИЛ-1 и др. [12]. Взаимодействие между макрофагами и гранулоцитами является важнейшим компонентом воспалительного ответа [5, 2]. Ряд цитокинов, синтезируемых моноцитами и макрофагами, такие как ИЛ-8, ИЛ-1, ФНО и другие могут активировать гранулоциты, однако практически ничего не известно о гранулоцитарных факторах, модулирующих активность моноцитов/макрофагов человека. Ранее нами было показано, что небольшие ка-

тионные белки α -дефензины способны запускать синтез ИЛ-8 в моноцитах человека [8]. В данной работе мы изучили влияние pCXCR2 на синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и бронхоэпителиальных клеток человека A549.

Материалы и методы исследования

Кровь здоровых доноров стабилизировали гепарином и наслаивали на одноступенчатый градиент Histopaque («Sigma»). После центрифугирования при 400 g в течение 30 мин слой клеток, находящийся в интерфазе отбирали и дважды отмывали средой RPMI-1640, содержащей 1 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Фракция моноцитов была получена путем адгезии суспензии клеток на пластике в течение 1 часа при 37 °С.

Адгезивные моноциты и клетки линии A549 культивировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде RPMI-1640, содержащей 5 % ЭТС в атмосфере 5 %-ного CO₂ при температуре 37 °С в присутствии факторов в течение 20 ч. Жизнеспособность клеток на всех этапах эксперимента составляла более 95 % по отношению к соответствующим контрольным образцам (по данным колориметрического теста с использованием витального красителя AlamarBlue). ИЛ-1 β (ООО «Цитокин» в концентрации 5 нг/мл использовали в качестве положительного контроля. ЛПС Escherichia coli («Sigma») добавляли в концентрации 200 пг/мл. Полимиксин Б («Sigma») использовали в концентрации 50 Ед/мл. pCXCR2 и N-гликозидазу F («NEB») смешивали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) из расчета 10 Ед фермента на 1 мкг pCXCR2 и преинкубировали в течение 2-х ч. при 37 °С перед добавлением к моноцитам, или преинкубировали по отдельности в ФСБ и смешивали в момент добавления к моноцитам. pCXCR2 и протеиназу К («Merck») смешивали в ФСБ из расчета 0,5 мкг фермента на 1 мкг pCXCR2 и преинкубировали в течение 2 часов при 37 °С перед добавлением к моноцитам, или преинкубировали по отдельности в ФСБ и смешивали в момент добавления к моноцитам. Содержание ИЛ-8 в культуральных супернатантах определяли ранее разработанным в нашей лаборатории твердофазным иммуноферментным методом [11].

Выделение pCXCR2 из мочи здоровых доноров (m-pCXCR2) проводили методом иммуноаффинной сорбции с последующей очисткой методом гель-проникающей хроматографии на колонке Zorbax GF-250 хроматографа высокого давления («Agilent») [1, 3, 4]. Чистота препарата pCXCR2 после иммуносорбции с последующей очисткой по показаниям оптической плотности составляла более 96 %. Содержание эндотоксина в очищенном препарате pCXCR2, определенное с помощью хромогенной тест-системы «Нусулт Biotech», не превышало 5 пг на 1 мкг pCXCR2.

Результаты исследования и их обсуждение

Чтобы определить, стимулирует ли рCXCR2 синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и бронхоэпителиальных клеток человека A549, мы инкубировали клетки в присутствии рCXCR2. Анализ культуральных супернатантов показал, что рCXCR2 в концентрации 0,2 мкг/мл и 1 мкг/мл повышал продукцию ИЛ-8 в 2,1 и 6 раз, соот-

ветственно, в культуре моноцитов (рисунок 1А). В культуре бронхоэпителиальных клеток человека A549 рCXCR2 не вызывал синтез ИЛ-8 (рисунок 1Б), что может свидетельствовать о специфическом действии рCXCR2 на моноциты и обеспечиваться специфическими рецепторами на клетках, связывание которых ведут к активации синтеза ИЛ-8 в моноцитах.

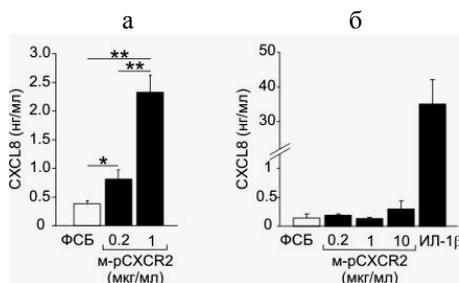


Рисунок 1 — Стимуляция синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов крови (а) и клеток линии А549 (б) под действием рCXCR2:

а — результаты пяти независимых экспериментов с моноцитами 5 различных доноров (среднее ± SEM); * P > 0,05, ** — P > 0,01, достоверность межгрупповых различий оценивали с использованием критерия t-Стьюдента.

б — результаты репрезентативного эксперимента (среднее значение ± SD)

При очистке белков из биологических жидкостей человека необходимо контролировать их загрязнение ЛПС грамм-отрицательных бактерий, который способен стимулировать лейкоциты крови. Для того, чтобы проверить, могут ли следовые количества ЛПС вызывать сходную индукцию ИЛ-8 в моноцитах, мы инкубировали моноциты с рCXCR2 (1 мкг/мл) в присутствии антибиотика полимиксина В, который нейтрализует действие ЛПС. Из рисунка 2 видно, что активность рCXCR2 наблюдается и в присутствии полимиксина В, который в том же эксперименте нейтрализовал ЛПС в концентрации, 20-кратной по отношению к его примеси в использованном препарате рCXCR2.

рCXCR2 представляет собой кислый гликопротеин, причем углеводная часть составляет более 2/3 молекулярной массы молекулы [4]. Чтобы установить какой компонент молекулы

рCXCR2 обеспечивает активность рCXCR2 в культуре моноцитов, мы использовали протеолитический фермент протеиназу К и дегликозилирующий фермент N-гликозидазу F.

При обработке препарата рCXCR2 протеиназой К и последующей нейтрализации фермента добавлением сыворотки индукция синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов полностью подавлялась. При контрольном добавлении сыворотки до инкубации препарата рCXCR2 с протеиназой К активность рCXCR2 (1 мкг/мл) не подавлялась (рисунок 3а). При исследовании действия N-гликозидазы F на активность рCXCR2 (рисунок 3б) было показано снижение активности рCXCR2, что свидетельствует о важности как белкового, так и углеводного компонента для проявления биологической активности рCXCR2 в культуре моноцитов крови человека.

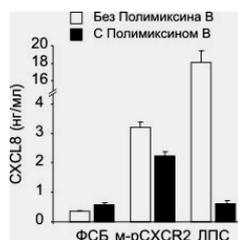


Рисунок 2 — Влияние липополисахарида на стимуляцию синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов крови человека. Представлены результаты репрезентативного эксперимента (среднее значение ± SD)

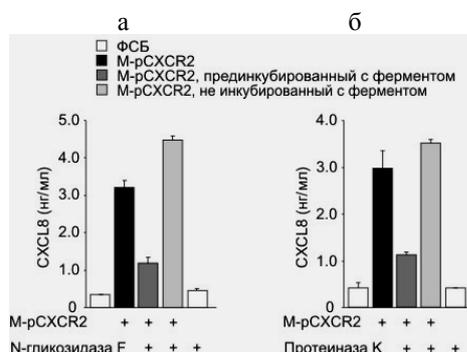


Рисунок 3 — Стимуляция синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов крови человека под действием рCXCR2 в присутствии либо отсутствии протеиназы К (а) и гликозидазы F (б). Представлены результаты репрезентативного эксперимента (среднее значение \pm SD)

Таким образом, нами впервые показана способность рCXCR2 стимулировать синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и установлено, что как белковая, так и углеводная части рCXCR2 необходимы для проявления этой активности. Это может указывать на наличие биологической активности у рCXCR2 *in vivo* в очаге воспаления и на его роль в реакциях естественного иммунитета, направленную на привлечение нейтрофилов в очаг инфекции и поддержания их активированного состояния.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Выявление и иммунохимическая характеристика растворимой формы рецептора CXCR2 интерлейкина-8 человека / С. Т. Акалович [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2008. — № 6. — С. 87–92.
2. Васильева, Г. И. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилонами доноров / Г. И. Васильева, И. А. Иванова, С. Ю. Тюкавкина // Иммунология. — 2000. — № 5. — С. 11–17.
3. Роль металлопротеиназ в регуляции экспрессии рецептора интерлейкина-8 CXCR2 на нейтрофилах человека / Ю. В. Котлинская [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2011. — № 3. — С. 83–87.
4. Биохимическая характеристика растворимой формы рецептора CXCR2 интерлейкина-8 человека / К. В. Котлинский [и др.] // Вестн НАН Беларуси. Сер. биол. наук. — 2009. — № 2. — С. 85–89.
5. Поташнев, М. П. Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении / М. П. Поташнев // Иммунология. — 1995. — № 4. — С. 34–40.
6. Akira, S. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR / S. Akira, H. Hemmi // Immunol.Lett. — 2003. — Vol. 85. — P. 85–95.
7. Baggiolini, M. Chemokines in pathology and medicine / M. Baggiolini // J. Intern. Med. — 2001. — Vol. 250. — P. 91–104.
8. Human neutrophil α -defensin modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells / Y. V. Chaly [et al.] // Eur. Cytokine Netw. — 2000. — Vol. 11. — P. 257–266.
9. Systemic neutralization of interleukin-8 markedly reduces neutrophilic pleocytosis during experimental lipopolysaccharide-induced meningitis in rabbits / R. A. Dumont [et al.] // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68. — P. 5756–5763.
10. Characterization of conserved viral leader RNA sequences that stimulate innate immunity through TLRs / A. Forsbach [et al.] // Oligonucleotides. — 2007. — Vol. 17. — P. 405–417.
11. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) / N. N. Nashkevich [et al.] // J. Immunol. Methods. — 2002. — Vol. 270. — P. 37–51.
12. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1) / T. Yoshimura [et al.] // J. Immunol. — 1987. — Vol. 139. — P. 788–793.

УДК 611.013.395+615.324

ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С. И. Кривенко, А. Л. Усс, Н. И. Дедюля

9-я городская клиническая больница, г. Минск

Перспективным и уже применяемым в клинической практике в Республике Беларусь направлением клеточной терапии является тандемная трансплантация гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток (ГСК и МСК) при онкогематологических заболеваниях и рассеянном склерозе. МСК также эффективно используются в качестве сопутствующей иммуносупрессивной терапии при возникновении острой и хронической РТПХ. Протоколы применения МСК для терапии онкогематологических больных и больных рассеянным склерозом утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Эффективность клеточной терапии с использованием МСК изучается в клинических исследованиях при лечении различных заболеваний: генетически обусловленных дегенеративных заболеваний скелета, ишемической болезни, цирроза печени, нейродегенеративных заболеваний (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера). Экспериментальные работы и клинические испытания показали положительный эффект трансплантации МСК при инфаркте миокарда и заместительной терапии при печеночной недостаточности.

Ключевые слова: стволовые клетки, трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», рассеянный склероз, кардиомиопластика, заболевания печени.

EXPERIENCE AND PROSPECTS OF THE CLINICAL APPLICATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS**S. I. Krivenko, A. L. Uss, N. I. Dedyulya****Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk**

Tandem transplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells is a perspective and now widely used direction of cell therapy of oncohematological diseases and multiple sclerosis in the clinical practice of the Republic of Belarus. Mesenchymal stem cells are also effectively used as concomitant immunosuppressive therapy of acute and chronic reaction Transplant Against Host (RTAH). The protocols of the application of mesenchymal stem cells for the therapy of oncohematological patients and patients with multiple sclerosis are approved by the Ministry of Public Health Care of the Republic of Belarus. The efficacy of the cell therapy with the use of mesenchymal stem cells is studied in the clinical research in the treatment for various diseases: genetic degenerative diseases of skeleton, ischemic disease, liver cirrhosis, neurodegenerative diseases (parkinsonism, Alzheimer's disease). The experimental work and clinical trials have shown the positive effect of the transplantation of mesenchymal stem cells in myocardial infarction and in the substitutive therapy of liver impairment.

Key words: stem cells, transplantation of mesenchymal stem cells, reaction «Transplant Against Host», multiple sclerosis, cardiomyoplasty, diseases of liver.

Введение

Расширение знаний о свойствах стволовых клеток, а также развитие медицинских технологий, позволившее выделять и идентифицировать данную клеточную популяцию из тканей организма, обеспечило активное внедрение методов клеточной терапии в трансплантологию, гематологию, регенеративной медицине, фармакологию. Отличительной особенностью стволовых клеток, на которой основано их применение в клинической практике, является их способность к самовозобновлению и к мультилинейной дифференцировке. Между стволовой клеткой и ее терминальным потомством обычно имеется несколько промежуточных клеток с возрастающей способностью к дифференцировке. Стволовые клетки недифференцированы, и в большинстве тканей не способны выполнять специальные функции.

Первоначальные исследования в области клеточной терапии были сконцентрированы на ГСК, трансплантация которых на сегодняшний день является стандартом лечения пациентов с онкогематологическими заболеваниями и аутоиммунной патологией. Отмечается ежегодное увеличение, как количества трансплантаций, так и числа центров, где они выполняются. По данным отчетов Европейской группы трансплантации гемопоэтических клеток крови и костного мозга (EBMT), за последние 15 лет число трансплантаций ГСК возросло с 4 234 до 24 168. В 2010 г. в Республиканском центре трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» выполнено 11 аллогенных и 70 аутологических трансплантаций ГСК.

В настоящее время в мире для расширения возможностей применения аллогенной трансплантации ГСК активно используются возможности банков стволовых клеток (на сегодняшний день это, в основном, гемопоэтические

клетки из различных источников, в т. ч. из пуповинной крови). В Республике Беларусь на базе 9-й ГКБ организован и функционирует банк пуповинной крови, имеющий в своих фондах более 200 образцов концентрата крови пуповинной-плацентарной, в т. ч. более 60 образцов персонифицированного хранения.

Новым направлением для практического здравоохранения Беларуси стало использование технологии трансплантации аутологических МСК больным рассеянным склерозом. В Республиканском центре трансплантации органов и тканей уже выполнено более 20 таких пересадок. Первые результаты работы нашего центра позволяют рассчитывать на то, что именно терапия стволовыми клетками даст возможность повысить эффективность лечения и качество жизни данной тяжелой категории больных.

Другим перспективным и уже применяемым в клинической практике в Республике Беларусь направлением является тандемная трансплантация ГСК и МСК при онкогематологических заболеваниях и рассеянном склерозе. Исследование с участием людей демонстрирует, что введение МСК также безопасно, как и введение ГСК [2, 3]. Более того, отсутствие экспрессии HLA-DR и иммуносупрессивные возможности МСК делают эти клетки подходящими для аллогенной трансплантации, снижая риск развития реакции отторжения. МСК из костного мозга и жировой ткани не провоцируют *in vitro* аллореактивность несовместимых лимфоцитов, а также подавляют реакцию в смешанных культурах лимфоцитов и пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены [2, 3].

Использование тандемной трансплантации ГСК и МСК основано на способности МСК поддерживать кроветворение, не только увеличивая число примитивных ГСК (преимуще-

ственно миелоидных и мегакариоцитарных предшественников), но и поддерживая их пролиферацию и дифференцировку. К совместной трансплантации ГСК и МСК, как правило, прибегают при недостаточности CD34+ клеток в трансплантате, что сопряжено с высоким риском его неприживления.

МСК также эффективно используются в качестве сопутствующей иммуносупрессивной терапии при возникновении острой и хронической РТПХ, которая является одной из основных причин, ограничивающих успешное проведение аллогенных трансплантаций гемопоэтических клеток.

В Республиканском центре трансплантации органов и тканей в 2010–2011 гг. выполнена 41 трансплантация МСК: 15 аллогенных (в т. ч. 8 от родственного донора и 7 от неродственного донора) и 26 аутологичных. Разработанные специалистами нашего центра протоколы применения МСК для терапии онкогематологических больных и больных рассеянным склерозом утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

По мере углубления наших знаний о стволовых клетках открываются новые перспективы для их клинического применения. Плюрипотентность стволовых клеток, их способность к самоподдержанию и миграции в очаг повреждения, а также к смене программ развития и дифференцировки дает им решающие преимущества по сравнению с дифференцированными клетками для применения в регенеративной медицине. Интерес к изучению наделенных высокой пластичностью к адаптивной дифференцировке и репрограммированию гетерогенных МСК (популяции стволовых клеток, из которых происходят специализированные клетки опорных тканей: костной, хрящевой, жировой, эндотелиальной, мышечной, клетки соединительной ткани, а также клетки ретикулярной ткани костного мозга), активно нарастает в последние годы из-за очевидных возможностей их практического применения. Высокий дифференцировочный и пролиферативный потенциал МСК, их низкая иммуногенность, а также относительная легкость в получении и наращивании их *in vitro*, вероятно, позволит этим клеткам конкурировать с эмбриональными стволовыми клетками в решении многих медицинских проблем. Особенно с учетом того, что клиническое применение эмбриональных клеток сопряжено с комплексом трудно решаемых технических и морально-этических последствий в области репродуктивного и терапевтического клонирования.

Эффективность клеточной терапии с использованием МСК изучается в клинических исследованиях при лечении различных заболеваний: генетически обусловленных дегенеративных заболеваний скелета, ишемической бо-

лезни, цирроза печени, нейродегенеративных заболеваний (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера). Одним из многообещающих подходов является трансплантация аутологичных МСК больным с ишемической болезнью сердца [3,5] и с заболеваниями печени [1].

Экспериментальные работы и клинические испытания показали положительный эффект трансплантации МСК при инфаркте миокарда [1, 4, 5]. Механизмы действия предположительно связаны с дифференцировкой МСК в кардиомиоциты и, как следствие, с пластической функцией последних, а также с продукцией факторов роста и противовоспалительных цитокинов. Кроме того, МСК оказывают противовоспалительное действие, подавляя иммунные реакции в очаге повреждения.

Для обеспечения заместительной функции трансплантата при кардиомиопластике применение МСК имеет ряд неоспоримых преимуществ перед традиционной органной трансплантацией. Во-первых, доступность клеточной кардиомиопластики на порядок выше трансплантации донорского сердца. Во-вторых, с учетом низкой иммуногенности МСК, снимаются ограничения, обусловленные различиями между фенотипами донора и реципиента. В-третьих, клеточную кардиомиопластику можно многократно повторять. В-четвертых, МСК функционально активны (вырабатывают факторы роста и регенерации). В-пятых, количество МСК у взрослого человека достаточно для относительно быстрого и технологически доступного культивирования [4].

В клинических исследованиях изучается возможность использования МСК для подавления воспалительных процессов, лежащих в основе печеночной недостаточности. В последнее время появились данные о стимуляции регенерации печени методом трансплантации стволовых клеток (гемопоэтических и/или мезенхимальных), которые способны давать начало клеткам печени *in vitro* и *in vivo*. Убедительно показанная на животных дифференцировка МСК в функционирующие гепатоцитоподобные клетки, а также доказанная безопасность введения и отсутствие каких-либо побочных реакций делают МСК наиболее перспективными кандидатами в клеточной терапии заболеваний печени, которая, в ряде случаев, может стать альтернативой органной трансплантации.

Однако наряду с исследованиями по применению клеточной терапии МСК, свидетельствующими о восстановлении как ткани печени, так и ее функции, существуют работы, доказывающие профиброгенный потенциал МСК. Поэтому эффективность введения МСК, например, при циррозе печени, может быть обусловлена улучшением состояния микроокружения и активацией за счет вырабатываемых внеклеточ-

ным матриксом паракринных факторов эндотелиальных гепатоцитов и их предшественников.

Исследования по применению МСК в терапии пациентов с тяжелой формой печеночной недостаточности, ожидающих трансплантации печени, начаты и в Республиканском центре трансплантации органов и тканей, перспективной задачей которого является расширение применения стволовых клеток для терапии различных состояний, в т. ч. и их применение в органной трансплантологии, а также создание новых стандартов лечения на основе стволовых клеток и активное внедрение этих высокотех-

нологических методов терапии в практику здравоохранения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Клеточные технологии при ишемической болезни сердца / А. Б. Смолянинов [и др.] // АГ-инфо. — 2006. — № 2. — С. 6–15.
2. Barry, F. P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F. P. Barry, J. M. Murphy // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* — 2004. — Vol. 36. — P. 568–584.
3. Gilgenkrantz, H. Mesenchymal stem cells: an alternative source of hepatocytes / H. Gilgenkrantz // *Hepatology.* — 2004. — Vol. 40. — P. 1256–1259.
4. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction / J. Guo [et al.] // *Inflammation.* — 2007. — Vol. 30(3–4). — P. 97–104.
5. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation / W. T. Tse [et al.] // *Transplantation.* — 2003. — Vol. 75. — P. 389–397.

УДК 611.018.26:616-006.3]:615.324

ТРАНСПЛАНТАТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ: ПОЛУЧЕНИЕ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

**С. И. Кривенко, Е. А. Назарова, Е. А. Селезнева, А. А. Коритко,
Н. И. Дедюля, А. Л. Усс, В. В. Смольникова, Е. С. Бузук**

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В работе определены стандартные условия получения трансплантата мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани для клинического применения в качестве котрансплантата при аллогенных пересадках гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Для обеспечения безопасности трансплантата помимо контроля его качества, включающего морфологический и иммунофенотипический анализ, при паспортизации МСК обязательными являлись результаты микробиологических тестов и теста на жизнеспособность. При выдаче МСК жировой ткани (ЖТ) для терапии оформлялся паспорт, разработанный ранее для систематизации сведений о трансплантате. По данному протоколу было подготовлено для клинического применения 19 трансплантатов МСК ЖТ, успешно использованных в качестве ко-трансплантатов при аллогенной пересадке ГСК и в терапии РТПХ у пациентов с онкогематологической патологией в УЗ «9-я городская клиническая больница».

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, посевная концентрация, иммунофенотип, клеточный трансплантат.

TRANSPLANT OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE: OBTAINMENT, STANDARTIZATION AND APPLICATION

**S. I. Krivenko, E. A. Nazarova, E. A. Selesniova, A. A. Koritko,
N. I. Dedyulya, A. L. Uss, V. V. Smolnikova, E. S. Buzuk**

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

The work determines the standard conditions for the obtainment of a transplant of mesenchymal stem cells from adipose tissue for the clinical application as co-transplant in allogenic transplantation of hemopoietic stem cells. To ensure the safety of the transplant besides its quality control, including morphologic and immunophenotypic tests, the results of microbiological tests and viability test were necessary in the categorization of mesenchymal stem cells. The registration certificate, devised earlier for the systematization of data on the transplant was drawn, when the mesenchymal stem cells from adipose tissue were distributed for the therapy. Nineteen transplants of the mesenchymal stem cells from the adipose tissue were prepared by this protocol for the clinical application. They were successfully used as co-transplants in the allogenic transplantation of hemopoietic stem cells and in the therapy of reaction Transplant Against Host in patients with oncohematological pathology in Minsk Municipal Clinical Hospital No.9.

Key words: mesenchymal stem cells, adipose tissue, inoculation concentration, immunophenotype, cell transplant.

МСК являются наиболее перспективным агентом для использования в клеточной терапии. Это связано с относительной простотой культивирования этой популяции стволовых клеток, с их

плюрипотентностью, способностью к самоподдержанию, высоким пролиферативным потенциалом, а также с низкой иммуногенностью и иммуносупрессивными свойствами [3, 4, 5]. МСК спо-

собны дифференцироваться в клетки самых разных типов тканей взрослого организма, в т. ч. в мышечную и жировую ткани, клетки сосудистого эндотелия, нервные клетки, в кардиомиоциты, что дает право признать за ними большие возможности для практического здравоохранения [1].

Универсальным источником получения мезенхимальных стволовых клеток является костный мозг. Однако к настоящему времени накоплен достаточно большой материал, указывающий на целесообразность их выделения из ЖТ. МСК, полученные из ЖТ, обладают хорошим пролиферативным потенциалом и могут быть получены в большом количестве, практически без финансовых затрат на заготовку нужного материала.

Цель исследования

Определение условий получения трансплантата МСК из ЖТ, его стандартизация для последующего применения в качестве котрансплантата при аллогенных пересадках ГСК.

Источником получения МСК послужили липоаспираты здоровых доноров ($n = 25$). Выделение клеток, их культивирование, морфологический анализ проводились по ранее разработанному протоколу [2]. Принадлежность выделенных клеток к мезенхимальным стволовым оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием следующей панели моноклональных антител (МКАТ): CD 45 PC 7, CD 34 APC, CD 105 PE, CD 90 FITC, CD 13 PE (Beckman Coulter, Великобритания). Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ «Statistica» 6.0 непараметрическим методом Уилкоксона и корреляционным анализом по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Для определения оптимальной посевной концентрации клеток мононуклеарной фракции, обеспечивающей максимальный выход МСК,

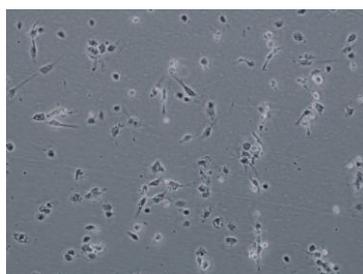
проанализированы данные культивирования 25 культур, отличавшихся исходной концентрацией клеток в первичной культуре. Все образцы ($n = 25$) были распределены на 3 группы в зависимости от посевной концентрации мононуклеарных клеток на см^2 площади дна культурального флакона: 1-я группа — до $100 \times 10^3/\text{см}^2$ ($n = 4$); 2-я группа — от 100 до $300 \times 10^3/\text{см}^2$ ($n = 10$) и 3-я группа — более $300 \times 10^3/\text{см}^2$ ($n = 9$).

Анализ полученных данных не выявил статистически значимых изменений ($p > 0,05$) (критерий Уилкоксона) выхода МСК ЖТ на стадии P0 при использовании разных посевных концентраций мононуклеарных клеток (в группах сравнения 1 и 2 — $p = 0,47$; в группах 1 и 3 — $p = 0,47$; в группах 2 и 3 — $p = 0,77$).

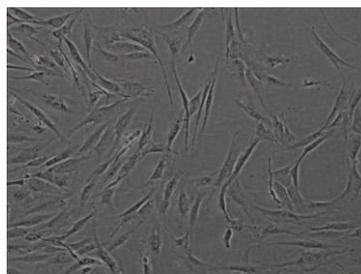
Также не было установлено достоверной корреляционной связи между посевной концентрацией мононуклеаров и количеством клеток, полученным на стадии первичной культуры в группе 1 ($R_s = 0,8$; $p = 0,2$), в группе 2 ($R_s = 0,12$; $p = 0,75$) и в группе 3 ($R_s = -0,47$; $p = 0,21$) (корреляционный анализ по Спирмену).

Следовательно, увеличение посевной концентрации мононуклеаров не гарантирует образования более плотного слоя адгезивных клеток и сокращения периода достижения 70–80 % конfluence в P0. В связи с этим, нами при получении трансплантата МСК в клинических условиях был установлен достаточно широкий диапазон для данного показателя: от 100×10^3 до 300×10^3 [2].

При морфологическом анализе исследуемых 25 культур МСК ЖТ уже в первые дни культивирования во многих образцах клетки постепенно приобретали характерную для МСК морфологию (имели вытянутую, веретенообразную форму) (рисунок 1).



а



б

Рисунок 1 — Морфология клеток на первый и четвертый день культивирования. Пассаж P0: а — МСК ЖТ (1-й день в культуре) $\times 100$, ФК; б — МСК ЖТ (4 дня в культуре) $\times 100$, ФК

В первичной культуре 90–100 % конfluence достигалась через 6–11 дней после их посева. Клетки имели специфическую направленность,

образуя т. н. «рыбьи косяки», типичные для монослоя в культуре МСК. Незначительные различия в достижении высокой степени конfluence мо-

гут быть связаны с индивидуальными особенностями ЖТ донора.

В процессе дальнейшего культивирования на пассажах P_1 – P_2 морфологические характеристики большинства культур практически не изменялись. Тем не менее, период образования монослоя (достижения 100 % конfluence) увеличивался от пассажа к пассажи (в среднем от 6–11 дней на стадии первичной культуры до 22–25 стадии на P_2 – P_3).

Наряду с морфологическим анализом культивируемых клеток трансплантат ($n = 19$ с средней клеточностью 20,40 млн — 3,61; 146,00) оценивался по следующим критериям:

1) оценка жизнеспособности по исключению трипанового синего;

2) контроль стерильности образца;

3) определение иммунофенотипа МСК.

Экспрессия маркеров клеточной поверхности (CD 90, CD 105, CD 13, CD 34, CD 45, HLA-

DR) МСК ЖТ исследовалась в процессе культивирования на разных пассажах.

На рисунке 2 представлены изменения экспрессии поверхностных маркеров в зависимости от стадии культивирования. На ранних этапах культивирования (P_1 – P_3) от 2 (0,6; 6,2) % до 8,9 (0,6; 21,9) % клеток экспрессировало маркер гемопоэтических стволовых клеток (CD 34). Однако на более поздних стадиях культивирования (P_4 – P_6) клетки приобретали более гомогенный профиль с постоянно высокими уровнями стромально-ассоциированных маркеров (CD 90, CD 105, CD 13) и низким уровнем CD 34. Все исследуемые клетки были негативны по маркерам CD 45 и HLA-DR, что является дополнительным свидетельством их низкой иммуногенности и возможности использования МСК ЖТ для аллогенной трансплантации без учета совместимости по тканевым антигенам.

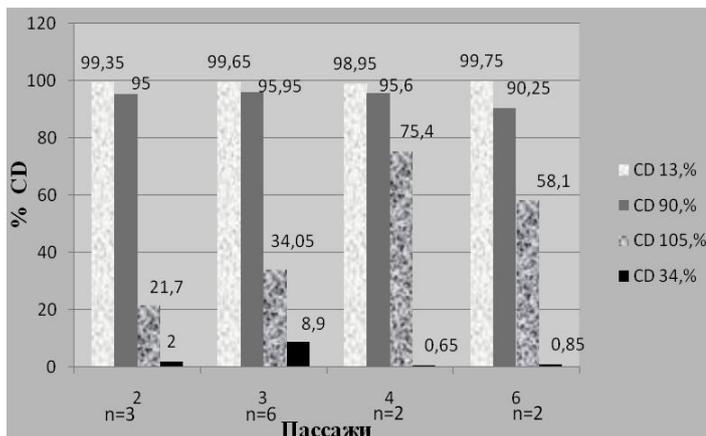


Рисунок 2 — Фенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток на протяжении всего периода культивирования (6 пассажей).

Примечание: уровень экспрессии поверхностных маркеров представлен значением медианы

Для обеспечения безопасности трансплантата помимо контроля его качества, включающего морфологический и иммунофенотипический анализ, при паспортизации МСК для клинического применения обязательными являлись результаты микробиологических тестов и теста на жизнеспособность. При выдаче МСК ЖТ для терапии оформлялся паспорт, разработанный нами ранее для систематизации сведений о трансплантате. Наличие этого документа является обязательным при использовании стволовых клеток в практической деятельности учреждений здравоохранения.

В рамках данного исследования по разработанному протоколу было подготовлено для клинического применения 19 трансплантатов МСК ЖТ, успешно использованных в качестве ко-трансплантатов при аллогенной пересадке

ГСК и в терапии РТПХ у пациентов с онкогематологической патологией.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов / В. И. Шумаков [и др.] // Вест. трансплантологии и искусственных органов. — 2002. — № 4. — С. 3–6.
2. Порядок проведения тандемной аллогенной трансплантации гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток у взрослых. Инструкция по применению: МЗ РБ № 003-0111 / А. Л. Усс [и др.]. — Минск, 2011. — 16 с.
3. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M. F. Pittenger // Blood. — 2005. — Vol. 105. — P.1815–1822.
4. Chamberlain, G. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing / G. Chamberlain // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25, № 11. — P. 2739–2749.
5. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow / Y. Jiang [et al.] // Nature. — 2002. — Vol. 418. — P. 41–49.

УДК 612.116+615.324

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РОСТА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОКЕ. А. Кузьмич¹, В. А. Змачинский², Н. Ф. Миланович³, Н. А. Новоселова⁴¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск³9-я клиническая больница, г. Минск⁴Объединенный Институт проблем информатики НАН Беларуси, г. Минск

Проведено изучение восстановления показателей гемопоэза после высокодозной химиотерапии (ВХТ) с аутологичной и аллогенной трансплантацией стволовых гемопоэтических клеток при применении комбинации гемопоэтических факторов роста — ЭПО и Г-КСФ в раннем посттрансплантационном периоде. В исследование включены 268 пациентов. Получено укорочение сроков восстановления гемоглобина, лейкоцитов и нейтрофилов в группе пациентов, получавших сочетанную терапию гемопоэтическими ростовыми факторами (ГРФ) после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Отмечено уменьшение сроков восстановления лейкоцитов и нейтрофилов, гемоглобина и эритроцитов в группе пациентов, получавших сочетанную терапию ГРФ после аллогенной ТКМ. В целом, применение ЭПО в комбинации с Г-КСФ привело к снижению гематологической токсичности.

Ключевые слова: трансплантация стволовых гемопоэтических клеток, эритропоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гемопоэз.

EFFICACY OF THE COMBINED APPLICATION OF HEMOPOIETIC GROWTH FACTORS AFTER STEM HEMOPOIETIC CELL TRANSPLANTATIONE. A. Kuzmich¹, V. A. Zmachinsky², N. F. Milanovich³, N. A. Novosiolova⁴¹Republican Research Center for Hematology and Transfusiology, Minsk²Belarussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk³Minsk Municipal Clinical Hospital № 9,⁴United Institute for Information Science Problems NAS of Belarus, Minsk

The restoration of hemopoiesis indices after high dose chemotherapy with autologous and allogeneic transplantation of stem hemopoietic cells with the combined use of hemopoietic growth factors — erythropoietin and granulocytic colony-stimulating factor at the early post-transplantation period has been studied. 268 patients were included into the investigation. The shortening of restoration terms of hemoglobin, leucocytes and neutrophils in the group of patients, undergoing the combined therapy of hemopoietic growth factors after autologous transplantation of stem hemopoietic cells. The shortening of restoration terms of hemoglobin, leucocytes and neutrophils in the group of patients, undergoing the combined therapy of hemopoietic growth factors after allogeneic marrow transplantation. In whole, the application of erythropoietin in the combination of with granulocyte colony-stimulating factor led to the decreased hematologic toxicity.

Key words: transplantation of stem hemopoietic cells, erythropoietin, granulocytic colony-stimulating factor, hemopoiesis.

Введение

В настоящее время ВХТ с последующей ТГСК является стандартом терапии таких заболеваний, как неблагоприятные формы острого миелобластного и лимфобластного лейкоза, хронические миелопролиферативные заболевания, миелодиспластический синдром, злокачественные лимфомы. Большинство химиопрепаратов, действуя циклоспецифически, максимальное повреждающее действие оказывают на быстро делящиеся клетки. В эту категорию, помимо опухолевых, попадают нормальные клетки-предшественники гемопоэза, а также клетки некоторых других тканей с высокой регенеративной активностью, что обусловлено недостаточной избирательностью

действия препаратов в отношении опухолевой ткани. Поэтому одним из неблагоприятных клинических проявлений цитостатической терапии, представляющих угрозу для жизни больного, является миелотоксичность [2].

Перспективным подходом для борьбы с миелотоксичностью высокодозной химиотерапии является применение ГРФ, ускоряющих пролиферацию и дифференцировку предшественников гемопоэза, что позволяет сократить период постцитостатической цитопении. В клинической практике наиболее часто применяются миелоидные колониестимулирующие факторы (Г-КСФ и ГМ-КСФ), а также эритроидный фактор роста (эритропоэтин) [4].

Многочисленные клинические исследования, проведенные с использованием Г-КСФ и ГМ-КСФ, показали достоверное укорочение срока нейтропении и связанных с ней осложнений по сравнению с контрольной группой [5, 7], а применение ЭПО после трансплантации ГСК приводило к более быстрому восстановлению уровня гемоглобина у больных после ВХТ с трансплантацией ГСК [3].

Одним из направлений в поиске повышения эффективности посттрансплантационной терапии пациентов является возможность усиления стимулирующего влияния ГРФ путем применения их различных комбинаций. В настоящее время изучается применение различных комбинаций ГРФ при режимах мобилизации ГСК. В клинических исследованиях было отмечено усиление мобилизационного эффекта при комбинированном назначении фактора стволовых клеток (с-kit лиганд) с Г-КСФ, чем монотерапии Г-КСФ. Применение модифицированных цитокинов, в частности, синтокина (ИЛ-3+Г-КСФ), оказывало большее мобилизующее действие, чем монотерапия Г-КСФ [6,8]. В литературе также имеются данные, что Г-КСФ и ЭПО обладают синергизмом с ГМ-КСФ и ИЛ-3 [1]. Однако достаточные данные об эффективности применения комбинации цитокинов при миелосупрессии после ВХТ в настоящее время отсутствуют. Вопрос об оптимальных режимах использования ГРФ и оценке эффективности снижения гематологической токсичности ВХТ с помощью ГРФ остается открытым.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 268 пациентов, которые в период 1994–2006 гг. были пролечены методом ВХТ с последующей трансплантацией аутологичных или аллогенных ГСК в Республиканском центре трансплантологии и клеточных биотехнологий при УЗ «9-я клиническая больница» г. Минска. Распределение числа больных по диагнозу было следующим: лимфома Ходжкина (ЛХ) — 88, множественная миелома (ММ) — 16, неходжкинская лимфома (НХЛ) — 12, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) — 9, острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) — 14, рак молочной железы (РМЖ) — 61, рассеянный склероз (РС) — 7, хронический миелолейкоз (ХМЛ) — 38, апластическая анемия (АА) — 21, миелофиброз с миелоидной метаплазией (МФ) — 1, острый промиелоцитарный лейкоз (ОПМЛ) — 1.

Из них в раннем посттрансплантационном периоде 90 пациентов получали Г-КСФ, 55 — сочетание ЭПО и Г-КСФ, остальные 123 не получали поддержки ГРФ. Оценка данных у пациентов, не получавших ГРФ и получавших только Г-КСФ, проводилась ретроспективно.

Гематологическими критериями восстановления кроветворения после ТГСК считали: аб-

солютное число нейтрофилов — $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$, лейкоцитов — $> 1,0 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов $> 20 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобина — $> 90 \text{ г/л}$, эритроцитов — $> 3,0 \times 10^{12}/\text{л}$.

Статистическая обработка данных проводилась с применением статистических программ «Excel» и «Statistika» 6.0 методами однофакторного и многофакторного анализа. При оценке достоверности уровень различий $p < 0,05$ считался статистически значимым.

Результаты исследования и их обсуждение

Для сравнения эффективности восстановления гемопоэза в исследуемых группах оценивали сроки достижения показателей периферической крови (лейкоциты, нейтрофилы, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты) после трансплантации аутологичных ГСК или аллогенного костного мозга (КМ).

Аутологичная ТГСК

Анализ показал, что время восстановления уровня лейкоцитов и нейтрофилов в группе пациентов, получавших ЭПО + Г-КСФ ($9,3 \pm 1,3$ и $9,3 \pm 1,4$ соответственно) достоверно короче, чем в группе пациентов, пролеченных только Г-КСФ ($10,2 \pm 1,4$ и $10,9 \pm 2,3$ соответственно) и не получавших ГРФ ($12,2 \pm 3,1$ и $13 \pm 3,5$ соответственно). Период восстановления гемоглобина в группе ЭПО + Г-КСФ достоверно короче по сравнению с группой, не получавшей терапии ГРФ ($8 \pm 4,6$ против $11,2 \pm 6,8$).

Аллогенная ТКМ

Анализ данных у пациентов после проведения аллогенной ТКМ показал, что время восстановления уровня эритроцитов, лейкоцитов и нейтрофилов в группе пациентов, получавших сочетание ЭПО + Г-КСФ ($12,6 \pm 9,3$; $15,2 \pm 5,4$; $13,3 \pm 4,6$ соответственно) достоверно короче, чем в группе пациентов, пролеченных только Г-КСФ ($20,8 \pm 10,1$; $19,6 \pm 6,3$; $19 \pm 7,3$ соответственно). В группе пациентов, не получавших стимуляции ГРФ, время восстановления уровня гемоглобина, эритроцитов и нейтрофилов было достоверно более продолжительным ($22,2 \pm 9,1$; $20,8 \pm 10$; $19,1 \pm 5,5$ соответственно), чем в группе больных, пролеченных сочетанием ЭПО + Г-КСФ ($13,8 \pm 9,7$; $12,6 \pm 9,3$; $13,3 \pm 4,6$ соответственно).

Таким образом, нами выявлено положительное влияние сочетанной терапии ЭПО + Г-КСФ на восстановление гемопоэза после проведения ВХТ с трансплантацией аутологичных и аллогенных ГСК. Выявленные факты указывают на эффективное стимулирующее действие сочетания ЭПО + Г-КСФ на восстановление гемопоэза после ВХТ, а также синергизм совместного применения ЭПО + Г-КСФ по сравнению с монотерапией Г-КСФ на восстановление показателей лейкопоэза.

Заключение

Сочетанное применение ЭПО и Г-КСФ в раннем посттрансплантационном периоде по-

сле аутологичной ТГСК и аллогенной ТКМ приводит к уменьшению проявлений гематологической токсичности по сравнению с применением монотерапии Г-КСФ или отсутствием в лечении ГРФ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Белозуова, М. Б. // Практическая онкология. — Т. 4, № 3. — 2003. — С. 183–190.
2. Птушкин, В. В. // Русский медицинский журнал. — 2004. — Т. 12, № 11. — С. 680–685.

3. Птушкин, В. В., Жуков Н. В., Миненко С. В. // Клиническая онкология. — 2005. — Т. 7, № 3.
4. Финогенова, Н. А. Характеристика гранулоцитарного колониестимулирующего фактора: показания к применению / Н. А. Финогенова // Современная онкология. — 2007. — Т. 9, № 4. — С. 18–20.
5. Aapro, M. S. // The Oncologist. — 2001. — Vol. 6. — P. 376–385.
6. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone / N. Flomenberg [et al.] // Blood. — 2005. — Vol. 106. — P. 1867–1874.
7. Kuter, I. // The Oncologist. — 2001. — Vol. 6. — P. 338–346.
8. Pusic, I. The Use of Growth Factors in Hematopoietic Stem Cell Transplantation / I. Pusic, J. F. DiPersio // Current Pharmaceutical Design. — 2008. — Vol. 14. — P. 1950–1961.

УДК 616.155.342:616.155.392-036.11

ИНТЕРЛЕЙКИН-6 КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ВЗРОСЛЫХ

О. Г. Лютаревич¹, С. И. Кривенко¹, М. В. Белевцев²

¹9-я городская клиническая больница, г. Минск

²Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, г. Минск

Проведена оценка возможности использования показателя плазменного уровня ИЛ-6 и экспрессии рецептора к данному цитокину для прогнозирования течения и исхода при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ). Установлено более чем десятикратное повышение плазменного уровня ИЛ-6 у больных ОМЛ до начала получения цитостатической терапии по сравнению со здоровыми людьми. Показатели плазменного уровня ИЛ-6 у больных ОМЛ не коррелировали с экспрессией рецептора к данному цитокину ни на иммунокомпетентных клетках, ни на бластах. Число Т-клеток, несущих на своей поверхности CD126 в целом у больных было достоверно ниже, чем у здоровых доноров. Регистрируемое в исследуемой когорте больных ОМЛ статистически достоверное снижение числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD126, формировалось, преимущественно, за счет показателей пациентов прогностически неблагоприятных групп. Была выявлена достоверная умеренная прямая корреляционная зависимость между числом опухолевых клеток, экспрессирующих CD126, и плотностью экспрессии данного рецептора. Число CD126-положительных бластов коррелировало также с уровнем лейкоцитов периферической крови, что подтверждает значительную роль ИЛ-6-опосредованных сигналов в опухолевой прогрессии при ОМЛ.

Ключевые слова: интерлейкин-6, острый миелобластный лейкоз, рецептор к интерлейкину-6, иммунокомпетентные клетки, опухолевая прогрессия.

INTERLEUKIN-6 AS A PROGNOSTIC FACTOR IN ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA IN ADULTS

O. G. Luitarevich¹, S. I. Krivenko¹, M. V. Belevtsev²

¹Municipal Clinical Hospital No.9, Minsk

²Republican Research Centre for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

To predict the course and outcome in acute myeloblastic leukemia (AML), the possibility of the application of interleukin-6 plasmic index and receptor expression to the given cytokine has been assessed. A more than tenfold increase of plasmic level of interleukin-6 had been determined in the AML patients in comparison with healthy people before they underwent the cytostatic therapy. The indices of interleukin-6 plasmic level in the patients with AML did not correlate with the receptor expression to the given cytokine neither on immunocompetent cells nor on blasts. In the whole there were reliably fewer T-cells, carrying CD126 on their surface in the patients than in the healthy donors. A statistically reliable increase in the number of T-lymphocytes expressing CD126, registered in the cohort of AML patients, was formed at the expense of the patients' indices in the predictively unfavourable groups. The reliably moderate straight correlative dependence was revealed between the number of tumorous cells, expressing CD126, and the expression density of this receptor. The number of CD126-positive blasts correlated also with the peripheral blood leukocyte level, which confirmed the significant role of the interleukin-6-associated signals in the AML tumorous progression.

Key words: interleukin-6, acute myeloblastic leukemia, receptor to interleukin-6, immunocompetent cells, tumorous progression.

Повышение плазменного уровня ИЛ-6 характерно для ряда онкологических заболеваний и ассоциировано с опухолевой прогрессией [1, 2]. Так, установлено, что уровень ИЛ-6 является

важным фактором прогноза тяжести и исхода заболевания при множественной миеломе. В настоящей работе было проведено исследование по оценке возможности использования по-

казателей плазменного уровня ИЛ-6 и экспрессии рецептора к данному цитокину для прогнозирования течения и исхода при ОМЛ.

В качестве объекта исследований использовалась периферическая кровь 10 здоровых доноров крови (контрольная группа) и 41-го больного с первично установленным диагнозом ОМЛ до начала цитостатической терапии. Все пациенты были разделены на группы в соответствии со стандартными клиническими критериями благоприятного и неблагоприятного прогноза течения и исхода ОМЛ: по возрасту (моложе и старше 60 лет), по результату индукционной терапии (вышедшие и не вышедшие в ремиссию) и общей выживаемости с момента постановки диагноза (более и менее 30 дней). Количественное определение уровня ИЛ-6 в плазме крови проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов BD OptEIA Human IL-6 Kit II («Becton Dickinson», США). Экспрессия рецептора к ИЛ-6 детектировалась методом проточной цитометрии с использованием R-фикоэритрин-конъюгированных мышиных моноклональных антител к α -цепи CD126 человека («Becton

Dickinson», США). Для математической обработки и статистического анализа данных, представленных в виде значений медианы и диапазона (25–75 перцентили), использовали программы «Microsoft Excel» и «Statistica» 6.0. Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с помощью U-теста Манна-Уитни. Оценку достоверности между зависимыми группами проводили с помощью теста Вилкоксона. При проведении корреляционного анализа использовался ранг Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Нами было установлено более чем десятикратное повышение плазменного уровня ИЛ-6 (26 (12,7–66,9) пг/мл, $n = 41$) у больных ОМЛ до начала получения цитостатической терапии по сравнению со здоровыми людьми (2 (1,8–2,30) пг/мл, $n = 10$, $p < 0,000001$). Однако при сравнении между собой групп пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом течения заболевания проведенный анализ корреляционных зависимостей не выявил взаимосвязей между данным показателем и клинико-гематологическими показателями больных (таблица 1).

Таблица 1 — Плазменный уровень интерлейкина-6 (пг/мл) в благоприятных и неблагоприятных прогностически значимых группах больных острым миелобластным лейкозом

Показатель	Группа благоприятного прогноза	Группа неблагоприятного прогноза
Возраст (моложе 60 лет/старше 60 лет)	16,45 (2,9–27,4) $n = 22$	44 (16,9–94,8)* $n = 19$
Результат индукции ремиссии (есть/нет)	26 (14,2–66,9) $n = 15$	25,35 (6,2–75,3) $n = 26$
Общей выживаемости (более 60 дней/менее 60 дней)	26 (14,2–75,3) $n = 27$	23,15 (5,8–49,8) $n = 14$

Примечание: * $p < 0,05$

Аномально высокий уровень ИЛ-6 не коррелировал также и с данными апоптотического ответа мононуклеарных клеток периферической крови пациентов указанных групп на *in vitro* воздействие цитостатиков, применяемых для индукционной терапии при ОМЛ (данные не приведены).

Лишь для пациентов, отнесенных в прогностически неблагоприятную группу по возрастному критерию (старше 60 лет), был характерен достоверно более высокий плазменный уровень ИЛ-6 по сравнению с молодыми пациентами.

Учитывая имеющиеся данные об аутокринном механизме регуляции опухолевого роста при ОМЛ с участием системы ИЛ-6-sIL-6R (растворимый рецептор к ИЛ-6), нами была исследована экспрессия рецептора к данному цитокину на различных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток и на бластах. Установлено, что показатели плазменного уровня ИЛ-6 не коррелировали с экспрессией рецептора к данному цитокину ни на иммунокомпетентных клет-

ках (Т-, В-лимфоциты, нейтрофилы), ни на бластах. В то же время, у здоровых доноров отмечалась высокодостоверная зависимость содержания ИЛ-6 в плазме от числа Т-лимфоцитов, несущих рецептор к данному цитокину ($R = 0,94$, $n = 10$, $p < 0,0001$), а также от плотности экспрессии CD126 на В-клетках ($R = 0,67$, $n = 10$, $p < 0,05$).

Следует отметить, что число Т-клеток, несущих на своей поверхности CD126 в целом у больных было достоверно ниже, чем у здоровых доноров (44 (35–51) %, $n = 25$ и 56 (47–65) %, $n = 10$, соответственно, $p < 0,05$), в то время как процент бластных клеток составлял 75 (32–92) % при степени иммунофлуоресценции 32 (22–44). Причем регистрируемое в исследуемой когорте больных ОМЛ статистически достоверное снижение числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD126, относительно значений данного показателя в группе здоровых людей сформировалось, преимущественно, за счет показателей пациентов прогностически неблагоприятных групп.

Так, в группе больных ОМЛ старше 60 лет число CD126+Т-лимфоцитов составило 42,5 (30–46) %, $p < 0,01$, в группе больных, не вышедших в ремиссию — 43 (30–51) %, $p < 0,05$; а для пациентов, умерших в течение 1 месяца после постановки диагноза, этот показатель составил 39 (24–46) %, $p < 0,01$ (достоверность различий для всех исследованных групп приведена относительно значений здоровых людей).

У больных ОМЛ была выявлена достоверная умеренная прямая корреляционная зависимость ($n = 25$, Spearman $R = 0,44$, $p < 0,05$) между числом опухолевых клеток, экспрессирующих CD126, и плотностью экспрессии данного рецептора, т. е., чем большее количество бластов несло рецептор к ИЛ-6 на своей поверхности, тем выше была и плотность его экспрессии. Интересно, что в прогностически благоприятных группах больных число опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор к ИЛ-6, достоверно не отличалось от аналогичного показателя в прогностически неблагоприятных группах, хотя и имело тенденцию к снижению. Число CD126-положительных бластов коррелировало ($n = 17$, Spearman $R = 0,50$, $p < 0,05$) также с уровнем лейкоцитов периферической крови больных ОМЛ, что еще раз подтверждает значительную роль ИЛ-6-опосредованных сигналов в опухолевой прогрессии при ОМЛ.

Полученные данные позволяют сделать вывод об участии рецепторного механизма ИЛ-6-CD126 в регуляции опухолевого роста при ОМЛ на фоне нарушения противоопухолевого иммунитета, обеспечиваемого иммунокомпетентными клетками посредством того же самого рецепторного механизма. Известно, что передача сигналов через трансмембранную форму ИЛ-6-рецептора на Т-лимфоцитах способствует пролиферации Т-клеток и их дифференцировке в цитотоксические Т-лимфоциты, играющие важную роль в противоопухолевом иммунитете. По нашему мнению, снижение числа Т-лимфоцитов, чувствительных к действию ИЛ-6, нарушает данное звено иммунитета, помогая опухолевым клеткам уходить от элиминирующего действия цитотоксических Т-клеток. Это, по-видимому, может быть связано с появлением в периферической крови опухолевых клеток,

несущих на себе данный рецептор. Таким образом, вероятно, опухолевые клетки берут на себя часть иммунорегуляторных функций, обеспечивая тем самым дисрегуляцию иммунной системы, позволяющую лейкоцитным клеткам активно уходить из-под противоопухолевой защиты.

Рассматривая влияние передачи сигналов через CD126 на обеспечение противоопухолевого иммунитета, сохранение которого повышает вероятность достижения длительной ремиссии у больных ОМЛ, следует также обратить внимание на высокую экспрессию CD126 на В-лимфоцитах у больных ОМЛ, вышедших в ремиссию после первого курса индукционной терапии, а также у больных с высокой продолжительностью жизни с момента постановки диагноза. Это может говорить о том, что действие ИЛ-6 на В-клетки, характеризующееся стимуляцией их дифференцировки в плазматические клетки и активацией процессов антителообразования при ОМЛ, играет положительную роль в динамике заболевания и может являться маркером благоприятного прогноза.

Феномен действия ИЛ-6 заключается в том, что помимо положительного участия в процессах регуляции гуморального иммунитета, он способен также играть негативную роль, будучи вовлеченным в поддержание опухолевого роста. Это подтверждается высокой степенью экспрессии рецептора к ИЛ-6 опухолевыми клетками и прямой корреляцией процентного числа CD126-положительных бластов с уровнем лейкоцитоза, высокий исходный уровень которого, сформированный за счет выхода бластов в периферическую кровь, является неблагоприятным прогностическим признаком ОМЛ и зачастую совпадает с отсутствием ответа на химиотерапию и быстрой гибелью пациентов. Очевидно, что повышенная экспрессия рецептора к ИЛ-6 бластными клетками таких больных — это показатель участия данного рецепторного механизма в поддержании жизни трансформированных клеток и опухолевой прогрессии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence / M. Trikha [et al.] // *Clinical Cancer Research*. — 2003. — Vol. 9. — P. 4653–4665.
2. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia / R. Lai [et al.] // *Cancer*. — 2002. — Vol. 95, № 5. — P. 1071–1075.

УДК 616.155.392-003.24-036.12-08

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА: МЕСТО РИТУКСИМАБА В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Н. Ф. Миланович

9-я городская клиническая больница, г. Минск

Рассматриваются современные подходы к лечению хронического лимфолейкоза, обосновывается применение при ритуксимаба — моноклонального антитела к CD20-рецепторам. Представлены результаты собственного ретроспективного анализа и рандомизированных клинических исследований, посвященных оценке эффективности ритук-

симаба в сочетании с химиотерапией при хроническом лимфолейкозе. На их основании был сделан вывод о превосходстве иммунохимиотерапии с ритуксимабом над химиотерапией в лечении больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Подчеркивается, что режим RFC можно считать новым стандартом терапии первой линии у больных В-ХЛЛ.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, моноклональные антитела, иммунохимиотерапия, режим R-FC.

PRESENT-DAY APPROACHES TO THE TREATMENT FOR CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA: APPLICATION OF RITUXIMAB IN CLINICAL PRACTICE

N. F. Milanovich

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

The present-day approaches to the treatment for chronic lymphatic leukemia have been considered, the application of rituximab, monoclonal antibody to CD20-receptors has been grounded. The results of the retrospective analysis and randomized clinical research, dedicated to the assessment of efficacy of rituximab in the combination with chemotherapy in CLL, have been presented. Based on these results, the conclusion about the advantage of immunochemotherapy with rituximab over the chemotherapy in the treatment of CLL patients has been made. It is emphasized, that R-FC mode can be considered as a new first-line therapy standard in CLL patients.

Key words: chronic lymphatic leukemia, monoclonal antibodies, immunochemotherapy, R-FC mode.

Введение

ХЛЛ относится к медленно прогрессирующим В-клеточным опухолям кроветворной системы, которое наиболее часто встречается у пациентов в возрасте старше 60 лет и характеризуется накоплением зрелых, однако иммунологически некомпетентных В-лимфоцитов. Ежегодная заболеваемость ХЛЛ составляет 3–3,5 на 100 тыс. населения, а в возрастной группе старше 65 лет — 20 случаев на 100 тыс. В республике Беларусь в 2009 г. зарегистрировано 497 новых случаев. На долю ХЛЛ приходится до 30 % от всех лейкозов и до 20 % от всех лимфом. У значительной части пациентов отмечается форма с быстрым прогрессированием. Существенно ухудшается и качество жизни пациентов. До настоящего времени ХЛЛ остается неизлечимым заболеванием. Вместе с тем, в течение последних десятилетий продолжительность жизни пациентов значительно увеличилась. Успехи в лечении ХЛЛ связаны с появлением новых лекарственных препаратов (пуриновых аналогов и моноклональных антител); выявлением новых прогностических факторов (иммунологических, цитогенетических и молекулярно-биологических); совершенствованием сопроводительной терапии. Это привело к изменению терапевтических подходов к лечению заболевания: если раньше целью терапии являлось лишь купирование симптомов болезни, то в настоящее время целью лечения является достижение качественной ремиссии и контроль минимальной резидуальной болезни (МРБ). Исторически в лечении ХЛЛ можно выделить три этапа: 1952–1985 гг. — использование алкилирующих агентов (хлорамбуцил и др.); начало 1980-х – 2000 гг. — использование флударабина, который продемонстрировал достоверно бо-

лее высокую эффективность, однако не улучшил показателей выживаемости; с 2000 г. — использование режимов иммунохимиотерапии [1–3].

Ритуксимаб (MabThera) — химерические моноклональные антитела мыши/человека, которые специфически связываются с трансмембранным антигеном CD20. После связывания с антигеном CD20 на В-лимфоцитах Ритуксимаб инициирует иммунологические реакции, опосредующие лизис В-клеток. Механизмы клеточного лизиса разнообразны: комплекс-зависимая цитотоксичность; антитело-зависимая клеточная цитотоксичность; прямая цитотоксичность (апоптоз); сенсбилизация В-клеток к цитотоксическому действию некоторых химиотерапевтических препаратов.

В этой работе мы представляем некоторые предварительные результаты ретроспективного анализа больных В-ХЛЛ, получавших терапию с применением ритуксимаба.

Материалы и методы исследования

Нами проанализированы результаты лечения 17 пациентов с ХЛЛ, в лечении которых использовался ритуксимаб, наблюдавшихся в УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска. В исследование включены 17 больных, 10 мужчин и 7 женщин. Медиана возраста больных составляла 58 лет (38–79 лет). Стадия А на момент начала терапии была констатирована у 2 (12 %), стадия В — у 11 (63 %) и стадия С — у 4 (25 %) пациентов. Б. Медиана времени от момента установления диагноза до начала терапии составляла 16,5 мес. (5,2–32,4 месяца).

Протокол лечения состоял из комбинации ритуксимаба с циклофосфамидом и флударабином (RFC): ритуксимаб в дозе 375 мг/м² назначался в 1-й день протокола; циклофосфамид в суточной дозе 250 мг/м² в 1–3-е дни протокола и флударабин в суточной дозе 25 мг/м² в 1–3-е дни.

Общее количество курсов — 6. Перерыв между курсами — 28 дней при удовлетворительных показателях крови и общем состоянии больного. Следующий курс начинали при количестве лейкоцитов не менее $3 \times 10^9/\text{л}$ и количестве тромбоцитов не менее $50 \times 10^9/\text{л}$, при отсутствии у больного в момент начала лечения инфекционных осложнений. При развитии цитопении и других осложнений увеличивали межкурсовые промежутки или отменяли лечение.

Главным показателем эффективности служила выживаемость без прогрессии (ВБП), определяемая как время от начала терапии до одного из следующих событий: прогрессия болезни (ПБ), рецидив после ремиссии, назначение нового варианта лечения, смерть от любой причины. В качестве второстепенных показателей эффективности оценивали частоту ремиссий и общую выживаемость (ОВ), вычисляемую от начала терапии до даты смерти или последнего визита. Полной ремиссией (ПР) считали исчезновение всех пальпируемых и определяемых по данным ультразвукографии и рентгенологического исследования органов грудной клетки лимфатических узлов, нормализацию размеров селезенки и картины крови. Результаты исследования костного мозга при оценке частоты ремиссий не учитывали. Частичную ремиссию (ЧР) констатировали при сокращении размеров лимфатических узлов и селезенки более чем на 50 %, уменьшении лимфоцитоза более чем на 50 %. Прогрессию болезни (ПБ) констатировали при увеличении размеров ранее пораженных или появлении новых лимфатических узлов, увеличении размеров селезенки и числа лимфоцитов во время терапии. Стабилизацией (СБ) считали все ситуации, не укладывающиеся в перечисленное. Рецидивом (РБ) считали появления или рост пальпируемых лимфатических узлов, селезенки, повышение абсолютного количества лимфоцитов.

Результаты и их обсуждение

Пять циклов терапии и более получили 88 % (15 человек) больных. Один больной был снят с лечения после 2-го курса из-за развития затяжной цитопении, и еще один в связи с ПБ после 3-х курсов. Случаев прекращения терапии из-за непереносимости ритуксимаба не было.

Эффективность лечения. Общий уровень объективного ответа составил 94 %: у 9 (53 %) пациентов достигнута ПР, у 7 (41 %) — ЧР, 1 (6 %) больной оказался резистентным к терапии. При медиане наблюдения, равной 20 мес. (от 11 до 28 мес.) было зарегистрировано 3 (17,6 %) неблагоприятных события, ВБП составила 71 %. При указанных сроках наблюдения умерли 2 (12 %) больных. К моменту анализа данных ОВ составляла 88 %. Мы оценили влияние факторов (возраст, время до лечения, стадия ХЛЛ) на результаты лечения. С худшей ВБП

независимо ассоциировалась стадия С. Возраст и время до начала терапии не оказывали влияния на исход лечения.

Анализ токсичности проведен для 94 циклов химиотерапии. Наиболее часто наблюдалась нейтропения III–IV степени — в 39 % циклов. При анализе факторов, определяющих миелотоксичность, установлено, что частота нейтропении существенно зависела от возраста. Лейкопения отмечена в 24 % циклов, анемия — в 15 %, тромбоцитопения — в 23 %. Реакции, вызванные реакцией на введение препарата, включая лихорадку, озноб, одышку и гипотензию, зарегистрированы на первом протоколе у 23 % больных. Однако после того как у этих больных был применен ступенчатый дозовый режим ($50 \text{ мг}/\text{м}^2$ в первый день, $325 \text{ мг}/\text{м}^2$ — во второй), этих симптомов не наблюдалось. Из инфекционных осложнений наиболее часто наблюдались лихорадка на фоне нейтропении, пневмонии и герпетические инфекции, которые составили Тяжелые инфекции, требующие госпитализации, возникли у 12 % пациентов.

Результаты этого ретроспективного исследования показывают, что добавление ритуксимаба к режиму FC у первичных больных ХЛЛ приводит к значительному улучшению всех клинических показателей эффективности. Это свидетельствует о значительном и длительно сохраняющемся преимуществе у больных, получавших этот режим. По данным исследователей из MD Anderson Cancer Center, добавление к флударабину циклофосфана сопровождалось умеренным повышением эффективности — с 29 до 35 % [4], а ключевое значение имело добавление именно ритуксимаба. В исследовании CALGB, где при сочетанном назначении флударабина и ритуксимаба без циклофосфана было получено 47 % ПР [5]. Поэтому важна комбинация всех трех препаратов — циклофосфана, флударабина и ритуксимаба. Это подтверждается и результатами исследования CLL8, которые показали, что у пациентов с ХЛЛ, получающих в качестве первой линии терапии комбинацию 6 циклов иммунохимиотерапии R-FC (доза ритуксимаба $500 \text{ мг}/\text{м}^2$) ВБП в среднем на 30 % лучше, чем у пациентов, получающих только химиотерапию (FC), при этом вероятность смерти от опухоли снижается на 36 % по сравнению с группой FC [6].

Заключение

1. Результаты проведенного анализа подтверждают, что добавление ритуксимаба к режиму FC в первой линии терапии значительно улучшает результаты лечения по всем показателям эффективности, причем это не сопровождается увеличением токсичности.

2. Рандомизированными клиническими испытаниями показано, что режим FCR можно

считать новым стандартом терапии первой линии у больных В-ХЛЛ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Johnson, S. [et al.] // *Lancet*. — 1996. — Vol. 347. — P. 1432–1438.
2. Rai, K. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 343. — P. 1750–1757.
3. Leporrier, M. [et al.] // *Blood*. — 2001. — Vol. 98. — P. 2319–2325/
4. Eichhorst, B. [et al.] // *Blood*. — 2006. — Vol. 107. — P. 885–891.
5. Byrd, J. C. [et al.] // *Blood*. — 2003. — Vol. 101. — P. 6–14.
6. Hallek, M. H. [et al.] // *Lancet*. — 2010. — Vol. 376. — P. 1164–1174.

УДК 615.324

НАХОЖДЕНИЕ ДОНОРА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ АНТИГЕНОВ СИСТЕМЫ HLA В ПОПУЛЯЦИИ БОЛЬНЫХ

Н. Ф. Миланович, В. И. Левин, А. Л. Усс, Г. В. Семенов

9-я городская клиническая больница, г. Минск

Обследовано 176 онкогематологических больных, их сибсы и 200 доноров крови. Идентифицировались HLA-антигены I и II класса. Показано, что для больных апластической анемией (АА), хроническим миелолейкозом (ХМЛ), острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и лимфогранулематозом (ЛГМ) совместимый сиблинг чаще всего подбирался при АА (57,5 % случаев). Вероятность подбора донора-сиблинга для больных трех других нозологий варьировала от 34,4 % — для ЛГМ, до 39,9 % случаев — для ОМЛ, ХМЛ занимал промежуточное положение — 38,3 %. Причиной более частого нахождения донора-сиблинга для больных АА являлись выявленные особенности в распределении у них и их сиблингов некоторых параметров системы HLA по сравнению с контрольной группой. Напротив, распределение HLA-параметров для больных трех остальных групп, равно как и у их сиблингов, не отличались от контрольных. Показано, что поиск неродственного донора для трансплантации возможен не только в регистре данных Республики Беларусь, но и в аналогичных регистрах других стран.

Ключевые слова: HLA-антигены, стволовые кроветворные клетки, апластическая анемия, лимфогранулематоз, трансплантация.

FINDING A DONOR FOR STEM CELLS DEPENDING ON THE DISTRIBUTION OF HLA ANTIGEN SYSTEM PARAMETERS IN THE PATIENT POPULATION

N. F. Milanovich, V. I. Levin, A. L. Uss, G. V. Semionov

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

176 oncohematologic patients, their sibs and 200 blood donors were examined to determine the possibility for related and unrelated donor for hemopoietic stem cell transplantation. HLA antigens I and II were identified and frequency of occurrence of certain parameters of this system was calculated. It was shown that the compatible sibling was most often selected in aplastic anemia (57,5 % cases) for the patients with aplastic anemia, chronic myeloleukemia (CML), acute myeloblastic leukemia (AML) and lymphogranulomatosis (LGM). The matching of a donor-sibling for the patients with three other nosologies varied from 34,4 % for LGM, up to 39,9 % cases for AML and CML took an intermediate position — 38,3%. Meanwhile the found values for the 3 later groups were not statistically different, but were reliably lower than for the patients with aplastic anemia. The revealed features in the distribution and their siblings of the HLA system parameters in comparison with the control group were the reason for more often finding a donor-sibling for the patients with aplastic anemia. The above mentioned values were identical among themselves (for the patients and siblings). On the contrary, the HLA-parameter distribution for the patients of the three other groups as in their siblings did not differ from the control groups. It has been established, that the citizens of Minsk have the Caucasian type of HLA-gene distribution. Consequently, the search for an unrelated donor for the transplantation is possible not only in the data register of the Republic of Belarus, but also in the analogous registers of other countries.

Key words: antigens of the main histocompatibility complex, hemopoietic stem cells, aplastic anemia, lymphogranulomatosis, hemopoietic stem cell transplantation.

Трансплантация гемопоэтических стволовых кроветворных клеток (ГСКК) широко используется в практике здравоохранения в комплексной терапии различных онкогематологических заболеваний [1, 3]. Успешно используется трансплантация ГСКК при лечении больных и в Республике Беларусь [2]. Здесь уместно подчеркнуть, что подавляющее большинство

аллогенных трансплантаций стволовых кроветворных клеток (СКК) (более 96 %) осуществлялось от идентичных в системе антигенов главного комплекса гистосовместимости (АГКГ) сиблингов. Дальнейшее увеличение трансплантаций СКК, как показывает опыт нашего центра и ведущих мировых центров, возможно лишь при широком использовании в качестве трансплантатов ГСК, по-

лученных от неродственных доноров [1, 4, 5]. Вместе с тем неизбежность данного положения предусматривает решение ряда вопросов, позволяющих оптимизировать процесс подбора пар донор-реципиент, как при близкородственных, так и неродственных трансплантациях. К ним относится, прежде всего, определение частоты нахождения донора ГСК среди сиблингов больных для различных нозологических форм заболеваний. Не меньший интерес представляет и определение возможной связи между распределением отдельных параметров АГКГ у больных разными нозологиями и частотой нахождения идентичного в системе HLA сиблинга. Решению этих вопросов и посвящено настоящее сообщение.

Под наблюдением находилось 176 больных, проходивших лечение в отделении трансплантации костного мозга УЗ «9-я городская клиническая больница». Из них 40 человек с диагнозом АА,

81 — ХМЛ, 23 — ОМЛ и 32 — ЛГМ. Одновременно обследовались сиблинги больных, количество которых было сопоставимым при всех нозологических формах и 200 доноров крови (контрольная группа). HLA-типирование для 376 обследованных проводилось серологически в Республиканском научно-практическом центре гематологии и переливания крови. У 32 больных лимфогранулематозом антигены главного комплекса гистосовместимости идентифицировались в лаборатории HLA типирования УЗ «9-я городская клиническая больница» (зав. лабораторией А. Ю. Старцева) с использованием генетического метода SSO. Статистическую обработку данных проводили, используя операционную систему Windows 98 с применением пакетов программ «Statistica» и «Excel».

В таблице 1 представлены данные подбора донора сибса для 176 больных различными онкогематологическими заболеваниями.

Таблица 1 — Результативность поиска родственного гистосовместимого донора для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Диагноз	Число больных	Подобрано гистосовместимых доноров	
		n	%
АА	40	23	57,5
ХМЛ	81	31	38,3
ОМЛ	23	9	39,1
ЛГМ	32	11	34,4
Всего	176	74	42

Как видно из представленных в таблице 1 данных, только в 74 (42 %) случаях среди сибсов больных был подобран донор для трансплантации. При этом отмечены различия процентного содержания совместимых по параметрам системы HLA-сибсов при различных заболеваниях. Для больных с АА совместимый сиблинг в семье обнаружен в 57,5 % случаев, в то время как в семьях больных с ЛГМ, нахождение родственного гистосовместимого донора составило лишь 34,4 % ($p < 0,05$). При других нозологиях эти цифры не отличались от таковых при ЛГМ ($p > 0,05$).

Анализ распределения иммуногенетических параметров системы HLA показал, что у больных с АА наиболее часто встречались антигены А2, А9, А10, В12, В7, В13, В18, В8 и В21. Редко встречались антигены В5, В17 и В41. Ни в одном случае не встретились антигены В14 и В37. Близкой к вышеописанным была частота встречаемости HLA-антигенов у сибсов больных АА. Часто встречались антигены А2, А3, А10, В7, В12, В18 и В27. Низкая встречаемость отмечена для антигенов А11, В14 и В41. И в этой группе обследованных полностью отсутствовал антиген В37. У больных АА самым частым в локусе А был фенотип А2Х. Также часто встречались фенотипы А2,9; А2,10. В локусе В были распространены фенотипы В7,40;

В12,18; В7,12; В12,У. У сибсов отмечались те же закономерности. Общим для сибсов и больных АА явилось и увеличение частот гаплотипов, имеющих А2 аллель (например, гаплотип А2В12 у сибсов имел частоту 0,083 % , у больных — 0,078 %; частота гаплотипа А2В18 у сибсов составляла 0,066 %, у больных — 0,097 %). Статистическая обработка полученных данных выявила достоверные различия частот встречаемости и распределения некоторых параметров системы HLA в контроле по сравнению с сибсами и больными при их отсутствии между двумя последними группами.

Анализ распределения отдельных иммуногенетических параметров системы HLA (локусов А и В) у больных ЛГМ по сравнению с их сибсами и контрольной группой показал отсутствие статистически значимых различий между ними. Вместе с тем у больных и их сибсов отмечено некоторое увеличение встречаемости антигенов А1В18 и уменьшение В27. Что касается распределения HLA антигенов II класса установлено, что у больных ЛГМ чаще, чем в контрольной группе встречаются антигены DR11 ($\chi^2 = 2,39$; RR=1,91) и DR13 ($\chi^2 = 3,12$; RR = 2,18), а реже DR16 ($\chi^2 = 0,77$; RR = 0,51). По-видимому, первые два антигена могут быть отнесены к протекторным для данного заболевания, а третий — к супрессирующим его развитие.

Полученные данные позволяют заключить, что частота нахождения родственного гистосовместимого донора связана с особенностями распределения некоторых параметров системы HLA у больных и их сибсов.

Учитывая, что одной из поставленных це-

лей проводимых исследований являлось определение возможностей поиска неродственного донора ГСКК для трансплантации, целесообразно было сравнить распределение HLA-антигенов белорусской популяции доноров с жителями других стран (таблица 2).

Таблица 2 — Сравнительные данные частоты HLA генов среди жителей г. Минска и других популяций

Антиген	г. Минск	г. Москва	г. Санкт-Петербург	Западная Европа	Польша
A1	0,1369	0,1403	0,1042	0,1580	0,1398
A2	0,2789	0,2986	0,3059	0,2700	0,2720
A3	0,1544	0,1288	0,1454	0,1260	0,1282
A9	0,1112	0,1242	0,1482	0,1036	0,1365
A25	0,0646	0,0635	0,0304	0,0204	0,0408
A26	0,0487	0,0476	0,0646	0,0395	0,0356
A11	0,0726	0,0529	0,0852	0,0506	0,0890
Aw19	0,0972	0,1013	0,0660	0,1499	0,0963
A28	0,0228	0,0258	0,0410	0,0439	0,0305
Ax	0,0127	0,0140	0,0006	0,0221	0,0112
B5	0,0646	0,0726	0,1148	0,0589	0,0824
B7	0,1254	0,1340	0,1489	0,1040	0,0890
B8	0,0540	0,0840	0,0775	0,0917	0,0673
B12	0,1056	0,0689	0,1042	0,1660	0,1000
B13	0,0566	0,0450	0,0339	0,0319	0,0566
B14	0,0228	0,0424	0,0373	0,0240	0,0305
B15	0,0619	0,0673	0,0605	0,0485	0,0513
B16	0,0593	0,0286	0,0301	0,0532	0,0764
B17	0,0461	0,0398	0,0386	0,0573	0,0566
B18	0,0945	0,0434	0,0541	0,0620	0,0356
B21	0,0126	0,0228	0,0179	0,0218	0,0303
Bw22	0,0305	0,0151	0,0233	0,0364	0,0566
B27	0,0434	0,0356	0,0510	0,0463	0,0566
B35	0,0835	0,0945	0,0635	0,0986	0,1112
B37	0,0177	—	0,0077	0,0112	—
B40	0,0673	0,0673	0,0622	0,0811	0,0513
B41	0,0202	0,0228	0,0282	—	0,0101
Bx	0,0340	0,1159	0,0532	0,0356	0,0282

Анализ представленных данных показал, что во всех рассматриваемых популяциях имеет место одинаковое значение частот HLA генов. Следовательно, при поиске потенциальных доноров СКК для неродственных трансплантаций реально существует возможность их нахождения не только в регистре данных Республики Беларусь, но и в аналогичных регистрах других стран. При этом предпочтение при интеграции следует отдавать странам с западнославянской популяцией населения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Зарецкая, Ю. М. HLA 50 лет / Ю. М. Зарецкая, Ю. А. Леднев. — Тверь, 2008. — 152 с.
2. Миланович, Н. Ф. Трансплантация гемопоэтических клеток в Республике Беларусь / Н. Ф. Миланович // Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины: тр. Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию Кировского НИИ гематологии и переливания крови. — Минск, 2010. — С. 254–256.
3. Трансплантация аллогенных и аутологичных гемопоэтических стволовых клеток при острых лейкозах (итоги 20-летнего опыта) / В. Г. Савченко [и др.] // Терапевтический архив. — 2007. — Т. 79, № 7. — С. 30–35.
4. Bone marrow donor's worldwide annual report 2008. — Leiden, 2009.
5. Bone marrow donor's worldwide annual report 2009 — Leiden, 2010.

УДК 616.155.392-003.24-036.11-053.2+615.324

АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК С ФЕНОТИПОМ CD34+CD38- И CD34+CD38-CD19+ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

Л. В. Мовчан, Т. В. Шман

Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, г. Минск

Методом многопараметрической проточной цитофлуориметрии определяли количество предполагаемых лейкоэмических стволовых клеток (ЛСК) в образцах костного мозга 54 пациентов с первичным В-линейным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) на момент диагностики лейкоза (0-й день), уровень минимальной ос-

таточной болезни (МОБ) определяли на 0-й и 15-й дни индукционной терапии. В ходе работы было выявлено, что среди клеток с фенотипом CD34+CD38- преобладали лейкоэмические предшественники В-клеток с фенотипом CD34+CD38-CD19+. Больше процентное содержание как CD34+CD38-, так и CD34+CD38-CD19+ среди общей популяции лейкоэмических клеток ассоциировалось с худшим ответом на терапию. Поэтому исходное количество таких клеток может рассматриваться как прогностический маркер при ОЛЛ у детей.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь.

ANALYSIS OF THE NUMBER OF CELLS WITH CD34+CD38- AND CD34+CD38-CD19+ PHENOTYPES AS POTENTIAL LEUKEMIC STEM CELLS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN

L. V. Movchan, T. V. Shman

Republican Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

The number of the supposed leukemic stem cells in marrow samples of 54 patients with primary B-linear acute lymphoblastic leukemia was detected by the method of multiparametric flow cytofluorimetry in leukemia diagnosis (zero day). The level of minimal residual disease was estimated on zero and on the fifteenth days of induction therapy. In the course of the research it was found out that leukemic B-cell precursors with CD34+CD38-CD19+ phenotype prevailed among the cells with CD34+CD38-phenotype. The high percentage of both CD34+CD38-, CD34+CD38-, and CD34+CD38-CD19+ among the general population leukemic cells was associated with a worse response to the therapy. Therefore, the initial number of such cells can be considered as a prognostic marker in acute lymphoblastic leukemia in children.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytofluorimetry, leukemic stem cells.

Введение

Актуальной проблемой в онкологии является выявление и характеристика свойств стволовых опухолевых клеток, которые иницируют и поддерживают рост опухоли, а также способствуют прогрессии заболевания. В середине 90-х гг. XX в. были получены первые экспериментальные данные о существовании особой популяции клеток при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) с иммунофенотипом CD34+CD38-, которая способна иницировать лейкоз в иммунодефицитных мышах [7]. Клетки с такими свойствами называют лейкоз иницирующими или лейкоэмическими стволовыми клетками (ЛСК) [2]. В случае с острым ОЛЛ нет единого мнения о фенотипе ЛСК. Есть данные указывающие, что клетки с фенотипом CD19-CD133+ [4], CD34+CD38+ CD19+ и CD34+CD38-CD19+ [6], CD34+CD19-, CD34+CD19+, так и CD34-CD19+ [8] обладают свойствами ЛСК. При этом выявлено, что количество клеток с фенотипом CD34+CD38- при диагностике лейкоза ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при ОМЛ у детей [10], а также прямо коррелирует с количеством остаточных лейкоэмических клеток при терапии ОЛЛ у детей [5].

Цель исследования

Исследование количества клеток с иммунофенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38-CD19+ в качестве потенциальных ЛСК, а также оценка взаимосвязи между их содержанием и ранним ответом на терапию при В-линейном ОЛЛ у детей.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 54 пациента с первичным В-линейным ОЛЛ. Среди них лейкозные клетки 4-х пациентов имели иммунофенотип Pro-B, common B — 47 пациентов, Pre-B — 3 пациента. Все пациенты проходили лечение по протоколу МБ-2008 в ГУ «РНПЦДОГ».

Определение количества предполагаемых ЛСК проводили в образцах костного мозга пациентов на момент диагностики лейкоза (0-й день), уровень МОБ анализировали на 0-й и 15-й дни терапии методом четырехцветной проточной цитофлуориметрии. Использовали моноклональные антитела, конъюгированные с FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7 в различных комбинациях. Для определения содержания предполагаемых ЛСК использовали комбинацию антител CD45/CD38/CD34/CD19. Для анализа МОБ использовали следующие комбинации антител — CD45/CD20/CD10/CD19; CD45/CD34/CD10/CD19; CD45/CD38/CD10/CD19; CD45/CD11a/CD10/CD19; CD45/CD58/CD10/CD19 и методику, описанную ранее [1]. Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter) в программе СХР. Учитывали не менее 500 тыс. клеток.

Статистический анализ проводили в программе «Statistica» 6.0. Результаты представлены в виде значений медианы и диапазона данных (25–75 перцентили). Достоверность различий между независимыми группами рассчитывали с помощью U-теста Манна-Уитни. Корреляционные зависимости оценивали по тесту Спирмана.

Результаты исследования и их обсуждение

Для 54 пациентов на момент диагностики ОЛЛ проанализировали количество лейкомиических

клеток с возможными лейкоз-иницирующими свойствами. На рисунке 1 представлен пример такого анализа.

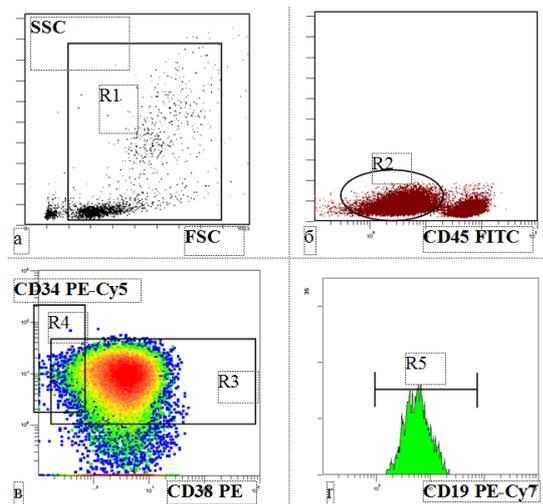


Рисунок 1 — Пример количественного анализа клеток предполагаемых ЛСК:

- а** — распределение клеток по светорассеиванию; **б** — распределение клеток по экспрессии CD45;
в — распределение клеток по экспрессии CD38 и CD34;
г — гистограмма распределения клеток по экспрессии CD19

Клетки с фенотипом CD34+CD38-CD19+ наиболее часто рассматривают в качестве потенциальных ЛСК при В-линейном ОЛЛ [9]. Для анализа их количества живые клетки выделяли по показателям прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания (а, регион R1), затем по сниженной экспрессии CD45 определяли регион бластных клеток (б, R2), далее среди бластных клеток рассчитывали количество CD34+ (в, регион R3), а также процент наименее дифференцированных CD34+CD38-клеток (в, регион R4). Так, как среди CD34+CD38-клеток могут быть представлены нормальные гемопоэтические предшественники, поэтому далее дополнительно рассчитывали количество CD34+CD38-клеток, экспрессирующих CD19 (г, регион R5).

Среди бластных клеток для всех проанализированных случаев медиана количества CD34+ клеток составила 61 (7,9–95,2) %, CD34+CD38-клеток — 1,6 (0,3–10,8) %, CD34+CD38-CD19+ клеток — 1,4 (0,1–10,6) %. Таким образом, наблюдали прямую корреляцию между содержанием CD34+CD38-CD19+клеток и количеством CD34+ (R = 0,5 при p < 0,0001) и количеством CD34+CD38-клеток (R = 0,98 при p < 0,0001).

Так как уровень МОБ является наиболее важным прогностическим фактором при ОЛЛ [3], поэтому мы проанализировали связь между количеством предполагаемых ЛСК и уровнем МОБ на 15-й день терапии. Для этого пациентов разделили на группы согласно уровню МОБ на четыре группы. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Количество предполагаемых лейкомиических стволовых клеток в группах пациентов с различным уровнем минимальной остаточной болезни на 15-й день терапии

Уровень МОБ, %	N	Количество клеток, % (27–75 перцентили)		
		CD34+	CD34+CD38-	CD34+CD38-CD19+
1 >1	15	77,3 (57,3–93,5)	4,7 (1,9–20,9) *3,4	3,5 (1,7–20,6) *3,4
2 0,1–1,0	17	72,9 (16,0–95,2)	5,1 (0,5–24,7) *4	4,7 (0,2–24,4) *4
3 0,01–0,09	8	27,6 (2,5–94,8)	0,4 (0,1–1,0)	0,3 (0,06–0,8)
4 <0,01	11	22,4 (1,1–96,6)	0,7 (0,005–1,1)	0,1 (0,004–1,1)

Примечание: *p < 0,05

Согласно представленным данным видно, что большее процентное содержание предпола-

гаемых ЛСК с иммунофенотипом CD34+CD38-CD19+, так и CD34+CD38- было выявлено в

группах пациентов с худшим ответом на терапию (уровень МОБ > 0,1 %) по сравнению с группами пациентов с меньшими значениями МОБ (< 0,1 %). При этом достоверных различий в содержании CD34+ клеток между исследуемыми группами не выявлено.

Таким образом, при первичном В-линейном ОЛЛ у детей среди клеток с фенотипом CD34+CD38- преобладали лейкоэмические предшественники В-клеток с фенотипом CD34+CD38-CD19+. Больше процентное содержание как CD34+CD38-, так и CD34+CD38-CD19+ среди общей популяции лейкоэмических клеток ассоциировалось с худшим ответом на терапию. Поэтому исходное количество таких клеток может рассматриваться как прогностический маркер при ОЛЛ у детей.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Определение остаточных опухолевых клеток в костном мозге детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом методом проточной цитофлюорометрии / М. В. Белевцев [и др.] // Клини. лаб. диагностика. — 2006. — № 10. — С. 42–46.

2. Becker, M. W. Leukemia stem cells in 2010: current understanding and future directions / M. W. Becker, C. T. Jordan // Blood Rev. — 2011. — Vol. 25(2). — P. 75–81.

3. Campana, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia / D. Campana // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. — 2010. — P. 7–12.

4. Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL / C. V. Cox [et al.] // Blood. — 2009. — Vol. 113(14). — P. 3287–3296.

5. High frequency of immature cells at diagnosis predicts high minimal residual disease level in childhood acute lymphoblastic leukemia / M. Ebinger [et al.] // Leuk. Res. — 2010. — Vol. 34(9). — P. 1139–1142.

6. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL / Y. Kong [et al.] // Leukemia. — 2008. — Vol. 22, № 6. — P. 1207–1213.

7. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice / T. Lapidot [et al.] // Nature. — 1994. — Vol. 367. — P. 645–648.

8. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties / C. le Viseur [et al.] // Cancer Cell. — 2008. — Vol. 14(1). — P. 47–58.

9. Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia / K. Wilson [et al.] // Haematologica. — 2010. — Vol. 95(4). — P. 679–683.

10. High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia / K. E. Witte [et al.] // Pediatr. Hematol. Oncol. — 2011. — Vol. 28(2). — P. 91–99.

УДК 616.155.392-003.24-036.12-08

АЛЕМТУЗУМАБ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

О. М. Морозова

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В статье освещены результаты международных клинических исследований по использованию алемтузумаба у пациентов с хроническим лимфолейкозом, приведены результаты собственного применения алемтузумаба как в монотерапии, так и в сочетании с химиопрепаратами (флударабином, циклофосфаном). Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение алемтузумаба у больных с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) является эффективным современным методом терапии.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, моноклональные антитела, алемтузумаб.

ALEMTUZUMAB IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA

O. M. Morozova

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

The article elucidates the results of the international clinical research into the application of alemtuzumab in patients with chronic lymphatic leukemia (CLL) and presents the results of the application of alemtuzumab both in monotherapy and in the combination with chemotherapeutics (fludarabine, cyclophosphane). The received results testify that the application of alemtuzumab in CLL patients is an effective up-to-date method of therapy.

Key words: chronic lymphatic leukemia, homogenous antibodies, alemtuzumab.

Введение

Алемтузумаб — это противоопухолевое средство, представляющее собой генно-инженерные гуманизированные IgG1 каппа моноклональные антитела, специфически связывающиеся с гликопротеином CD52, который экспрессируется на поверхности нормальных и малигнизированных В- и Т-лимфоцитов крови и не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках [1].

В 2001 г. алемтузумаб был зарегистрирован в США и странах ЕС для лечения рецидивов у больных с ХЛЛ, получавших лечение алкилирующими препаратами и аналогами пуринов. Keating и соавт. [2] изучали эффективность и безопасность монотерапии алемтузумабом у больных ХЛЛ с резистентностью к флударабину. У 93 больных с доказанной резистентностью к флударабину медиана выживаемости

достигших ремиссии больных была 32 мес., а во всей группе — 16 мес. В исследовании Moreton и соавт. [3] монотерапию алемтузумабом проводили больным В-ХЛЛ, рецидивировавшим после стандартной химиотерапии, или приобретшим резистентность к ней. Из 91 больного у 44 была констатирована резистентность к аналогам пуринов. На фоне лечения 32 (36 %) больных достигли полной, 17 (19 %) — частичной ремиссии и у 42 (46 %) больных эффекта не было. Из 44 больных с резистентностью к аналогам пуринов ответ на алемтузумаб был получен у 22 (50 %). Иммунофенотипическая ремиссия была достигнута у 18 (20 %) больных. Предварительное исследование комбинации алемтузумаба и флударабина проведено Kennedy и соавт. [4]. Авторы подобрали 6 больных, у которых была доказана резистентность к флударабину и получен слабый эффект на алемтузумаб. Сочетанное применение этих препаратов позволило получить одну полную и 4 частичных ремиссии, причем у 2-х больных в костном мозге не определялось минимальная остаточная болезнь, оцениваемой с помощью 4-х-цветной проточной цитофлуориметрии.

В нашем исследовании мы оценивали возможность применения различных схем лечения больных с ХЛЛ с использованием алемтузумаба, побочные и токсические эффекты этих схем, что позволило бы более широко применять алемтузумаб для лечения больных с ХЛЛ.

Материалы и методы исследования

С января 2007 по июнь 2011 гг. на базе гематологических отделений УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска алемтузумаб использовался в лечении у 28 пациентов с ХЛЛ. Применялись следующие схемы введения препарата: 1) монотерапия алемтузумабом — 13 пациентов; 2) сочетание алемтузумаба с флударабином (FluCamp) — 9 пациентов; 3) с флударабином и циклофосфаном (Camp+FC) — 6 пациентов.

В качестве монотерапии после эскалации начальной дозы алемтузумаб вводился подкожно в дозе 30 мг 3 раза в неделю, продолжительность курса — до 12 недель. Режим FluCamp заключался в том, что флударабин в дозе 30 мг/м² назначался в 1, 2, 3-й день, алемтузумаб в дозе 30 мг назначался подкожно в 1, 2, 3-й день. В случае применения режима Camp+FC циклофосфамид назначался внутривенно в дозе 250 мг/м², флударабин — внутривенно в дозе 30 мг/м² в 1, 2, 3-й день, алемтузумаб — подкожно в дозе 30 мг в 1, 2, 3-й день. Курсы терапии FluCamp и Camp+FC повторялись каждые 28 дней. За 30 минут до введения алемтузумаба назначался парацетамол в дозе 0,5 г внутрь, лоратадин в дозе 0,1 г внутрь. Сопутствующая терапия включала ацикловир внутрь в дозе 0,2 г 3 раза в день, котримоксазол в дозе 480 мг 1 раз в сутки внутрь.

Следует отметить, что мы отказались от внутривенной инфузии алемтузумаба в связи с развитием у всех пациентов выраженной системной реакции в виде озноба и гипертермии.

Результаты исследования и их обсуждение

Из 28 пациентов, получавших алемтузумаб, было 6 (21 %) женщин и 22 (79 %) мужчин. Возраст пациентов был от 27 до 67 лет (медиана — 55 лет). Стадия С по Binnet установлена у 13 пациентов (46 %) и В — у 15 (54 %). Медиана заболевания составила 67 мес. (от 14 до 111 мес.). Практически все пациенты (за исключением 1-го больного) ранее получали различные виды химиотерапии — лейкеран, флударабин, FC, COP, CNOP. Количество ранее проведенных курсов химиотерапии — от 2-х до 22-х. У 1-го больного отмечались аутоиммунные осложнения хронического лимфолейкоза (анемия, тромбоцитопения).

Монотерапия алемтузумабом назначалась в течение от 4-х до 12 недель. Надо отметить, что полный курс терапии получили лишь 6 пациентов из 13. Причиной отмены препарата были инфекционные осложнения: у 6 (46 %) отмечались бактериальные инфекции верхних дыхательных путей, у 1 (8 %) — генерализованная вирусная инфекция. У всех больных отмечалось уменьшение абсолютного количества лимфоцитов в периферической крови уже в течение 1-й недели лечения. Нормализация лейкограммы отмечалась к 3–4-й неделе введения алемтузумаба. Однако длительность полученного эффекта была разной: от 0 до 19 мес. после окончания терапии алемтузумабом. Частым побочным эффектом алемтузумаба были местные аллергические реакции (покраснение и припухлость в месте инъекции препарата). Одним из частых побочных эффектов применения алемтузумаба в течение первых 1–3 недель лечения была тромбоцитопения (5 пациентов), которая чаще всего не требовала коррекции, однако 3-м пациентам назначалась заместительная терапия тромбоконцентратом. К концу 3-й недели терапии количество тромбоцитов увеличивалось и дальнейшей коррекции не требовало. Надо отметить, что в целом препарат переносился хорошо, госпитализация требовалась только в течение первых 2–3-х недель, дальнейшее лечение пациенты получали в условиях дневного стационара. Клинико-гематологическая ремиссия достигнута у 8 (62 %) пациентов, из них у 4-х — иммунофенотипическая ремиссия, продолжительность которой была от 4-х до 19 мес. (в среднем 12 месяцев). У 4-х больных отмечался частичный эффект: снижение количества лейкоцитов, без нормализации лейкограммы. У 1-го пациента сразу после отмены препарата заболевание прогрессировало. Следует отметить, что из 13 пациентов у 9 (69 %) была установлена стадия заболевания С. У пациента с аутоиммунными

осложнениями ХЛЛ отмечено восстановление гемоглобина и тромбоцитов в течение лечения, эффект лечения оказался длительным. Наиболее эффективным лечение оказалось у больных без выраженной лимфоаденопатии.

В случае наличия у пациентов лимфоаденопатии (наибольший размер лимфоузлов > 2 см в диаметре) принималось решение о назначении курсов FluCamp и Camp+FC. Количество курсов терапии составило от 2-х до 8-ми. У всех пациентов отмечались аллергические реакции в месте инъекции алемтузумаба, повышение температуры тела до 38 °С. Тромбоцитопения и глубокая нейтропения не наблюдалась ни у одного больного. Из 15 пациентов у 2 (13 %) получена клинико-гематологическая и иммунофенотипическая ремиссия, продолжительность которой составляла 12 и 19 мес.; частичный эффект отмечался у 11 (74 %) пациентов, у 2-х (13 %) — эффекта не было. Лечение пациенты переносили хорошо, большинство больных не нуждались в госпитализации в круглосуточный стационар. Количество курсов терапии зависело от эффективности терапии, а также от наличия или отсутствия инфекционных осложнений. В течение терапии у 4 (26 %) больных развилась острая пневмония, у 1-й пациентки — генерализованная герпетическая инфекция.

Заключение

1. Лечение пациентов с ХЛЛ с использованием алемтузумаба является эффективным как

в монотерапии, так и в сочетании с химиотерапевтическими препаратами.

2. При наличии у пациента лимфоаденопатии следует отдавать предпочтение сочетанию алемтузумаба с химиопрепаратами.

3. С осторожностью следует применять алемтузумаб у пациентов с частыми инфекционными осложнениями и не применять при наличии активной вирусной инфекции (герпес, цитомегаловирус и т. п.).

4. Подкожное введение алемтузумаба является наиболее приемлемым, т. к. снижает количество системных побочных эффектов и позволяет применять препарат амбулаторно.

5. Алемтузумаб может быть назначен пациентам с ХЛЛ при любой стадии заболевания, при наличии аутоиммунных осложнений, а также при наличии химиорезистентности к ранее проведенной химиотерапии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) / J. Lundin // *Blood*. — 2002. — Vol. 100 (3). — P. 768–773.
2. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patient, who have failed fludarabine: results of a large international study / M. J. Keating // *Blood*. — 2002. — Vol. 99. — P. 3554–3561.
3. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival / P. Moreton [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 2971–2979.
4. Campath-1H and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia / B. Kennedy [et al.] // *Blood*. — 2002. — Vol. 99. — P. 2245–2247.

УДК 616.438:615.849.5

ИЗМЕНЕНИЙ ТОПОЛОГИИ ТИМОЦИТОВ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ТИМУСА В БЛИЖАЙШИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ

И. А. Никитина, А. И. Грицук

Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель

Проведенный на белых крысах эксперимент показал, что острое воздействие ионизирующего излучения в дозе 1 Гр приводит к существенному снижению уровня энергетического метаболизма и изменению таких морфологических параметров тимоцитов, как размер клетки, индекс объема и плотность структурных элементов на ее поверхности. На десятые сутки наблюдается частичное восстановление морфологических признаков, но митохондриальное дыхание продолжает оставаться в угнетенном состоянии.

Ключевые слова: тимоциты, ионизирующее излучение, тканевое дыхание.

CHANGES IN THYMOCYTE TOPOLOGY AND INDICES OF THYMUS ENERGETIC EXCHANGE AT THE EARLIEST TERM AFTER IRRADIATION

I. A. Nikitina, A. I. Gritsuk

Gomel State Medical University, Gomel

The experiment that had been carried out on rats showed that acute exposure of ionizing radiation at a dose of 1 Gy led to a significant decrease of the level of energetic metabolism and change of such morphological parameters of thymocytes as a cell size, dimension index and density of structural elements on its surface. On the tenth day a partial restoration of the morphological features was observed but mitochondrial respiration stays in a depressed state.

Key words: thymocytes, ionizing radiation, tissue respiration.

Введение

Научно-технический прогресс сопровождается все более широким использованием ионизирующего излучения в различных сферах деятельности человека. В этих условиях возрастает риск появления различного рода инцидентов, а значит, увеличивается число людей, которые могут быть вовлечены в аварийные ситуации. Так, по данным статистики, в течение последних десятилетий за год происходит до четырех аварийных ситуаций, приводящих в среднем к одному случаю с фатальными последствиями и к 5–6 серьезным клиническим последствиям для пострадавших [1].

Ввиду высокой радиочувствительности иммунной системы, многие проявления радиационного поражения организма прямо или косвенно связаны с нарушениями в иммунной системе. Необходимо отметить, что воздействие ионизирующего излучения приводит не только к нарушению иммунных функций, но и к изменению общей морфологии лимфоцитов, включая их топологию [2]. Изменение клеточной поверхности во многом обусловлено особенностями механических свойств мембран иммунных клеток. Одной из причин данного явления может быть радиационно-индуцированная активация процессов перекисного окисления липидов, приводящая к заметному возрастанию вязкости мембран. В результате нарушения клеточного гомеостаза изменяется проницаемость мембран, возрастает выход кальция из клеток. Для возврата клеточной системы в исходное состояние требуются большие затраты энергии, что увеличивает нагрузку на систему митохондриального окисления.

Следует указать, что процессы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования являются интегральным показателем состояния клетки. Они характеризуют не только метаболизм, но и состояние мембран, поэтому анализ функциональной активности митохондрий способен указать на основные нарушения, происходящие при негативном внешнем воздействии.

Для дальнейшего исследования механизмов развития и степени выраженности патологических процессов в иммунной системе при воздействии ионизирующего излучения целесообразным является анализ состояния поверхностных структур лимфоцитов и выявление функциональных изменений в митохондриях. Анализ взаимосвязи структурных и функциональных изменений клеток тимуса после облучения поможет глубже понять основные механизмы развития процессов клеточной патологии в организме, подвергшемся радиационной нагрузке.

Цель исследования

Оценить влияние внешнего острого ионизирующего облучения на биохимические показатели тканевого дыхания вилочковой железы и морфологию тимоцитов крыс.

Материалы и методы исследования

При проведении исследований соблюдались все требования Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (18.03.1986, пересмотр. 02.12.2005, Страсбург) и Директивы 86/609/ЕЕС «Защита животных, используемых в научных целях» (в редакции от 05.05.2009, Страсбург).

Экспериментальные животные — белые, беспородные крысы-самцы массой 200–230 г, содержались на стандартном рационе. Рандомизированным отбором сформировано две группы животных: опытная ($n = 10$) и контрольная ($n = 5$). Опытную группу животных подвергли однократному общему γ -облучению на установке «ИГУР-1», источник ^{137}Cs в дозе 1 Гр, мощность дозы — 0,92 Гр/мин.

Анализ состояния клеток тимуса проводили на 3 и 10-е сутки после облучения согласно [3]. Исследования тимоцитов на атомно-силовом микроскопе (АСМ) «НТ-206» («Микро-ТестМашина», Беларусь) и обработку полученных данных осуществляли согласно [4].

Полученные данные проанализированы на соответствие распределения нормальному закону с использованием критерия хи-квадрат Пирсона. Данные, подчиняющиеся нормальному закону, представлены в виде 95 % доверительного интервала ($m \pm \Delta m$, n — размер выборки), а сравнение средних осуществлялось с помощью t -критерия Стьюдента. Остальные данные представлены медианой и границами верхнего и нижнего квартилей. Сравнение выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Различия признавались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Уровень энергетического метаболизма является интегральным показателем, отражающим общее состояние метаболизма и функциональную активность клеток, поскольку все клеточные функции энергозависимы, а сами митохондрии тесно взаимодействуют с цитоскелетом и другими органеллами.

Уровень дыхания тимоцитов животных контрольной группы на эндогенных субстратах составил: 6,5; 5,2–8,0 нмоль O_2 /мин на 1 мг белка. Довольно высокий уровень дыхания ассоциируется с высокой пролиферативной активностью тканей тимуса.

Ионизирующее излучение в дозе 1 Гр оказывает сильное влияние на дыхательную активность тимуса. На 3-е сутки после облучения скорость тканевого дыхания снижается более чем на треть и составляет 4,3; 3,4–4,9 нмоль O_2 /мин на 1 мг белка ($p < 0,05$ в сравнении с контролем). К 10-м суткам уровень тканевого дыхания остается значительно ниже контрольных значений и не отличается от показателей на 3 сутки.

Полученные с помощью АСМ, трехмерные изображения адгезированных к подложке (стеклянной пластинке) интактных тимоцитов (рисунок 1а) выявляют куполообразную форму этих клеток. Поверхность клеток относительно ровная и гладкая.

Для большинства тимоцитов в области контакта с подложкой хорошо различимы ламеллоподии, тонкие, листовидные выпячивания, каркасом которых служат трехмерные сети филаментов. Увеличение времени адгезии приводит к появлению в этой зоне единичных пальцеобразных структур — филоподий.

Воздействие ионизирующего облучения в дозе 1 Гр приводит к изменению ряда морфологических показателей тимоцитов (рисунок 1а и 1б). Так, на 3-е сутки после облучения (таблица 1) происходит уменьшение размаха высот клеток в пределах 95 % вариации (более чем в 2 раза) и их диаметра. Кроме этого уменьшается объем тимоцитов и форма клеток. На их поверхности появляются выраженные неровности.

К 10-м суткам после облучения в тимусе активируются процессы восстановительного постлучевого лимфоцитопоза, в котором принимают участие популяция относительно радиоустойчивых тимоцитов. По ряду признаков (рисунок 1в) тимоциты на 10-е сутки после облучения сходны с контрольными клетками, но есть и отличия. Так, высота и диаметр (таблица) тимоцитов крысы на 10-е сутки после облучения возрастают (в сравнении с 3-ми сутками) и достигают значений контрольных тимоцитов. В тоже время объем клеток, хотя и возрастает, но не достигает контрольных значений и остается достоверно более низким.

Индекс объема тимоцитов (отношение объема к площади поверхности клеток) резко уменьшается на 3-е сутки после облучения. Это может служить свидетельством увеличения удельных обменных потоков (вещество, энергия, информация) между клеткой и окружающей средой.

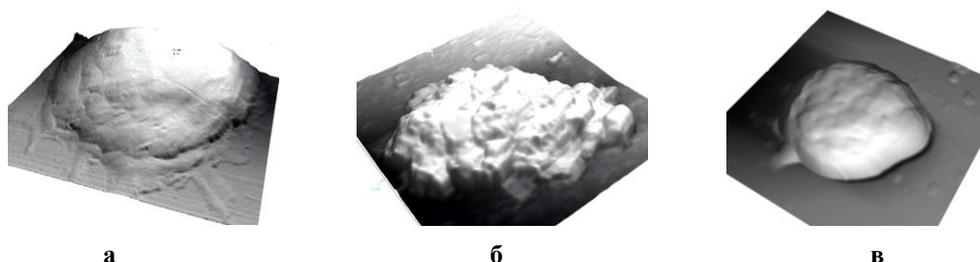


Рисунок 1 — Изображение тимоцитов крысы (режим топографии (topography), область сканирования 9×9 мкм), полученное на атомно-силовом микроскопе:

а — внешний вид интактного тимоцита; б — тимоцит крысы на 3-е сутки после острого γ -облучения; в — тимоцит крысы на 10-е сутки после острого γ -облучения

Таблица 1 — Характеристики поверхности контрольных и облученных тимоцитов, полученные в режиме сканирования (топографии)

Параметры	Контроль	3 сутки после облучения	10 сутки после облучения
Размаха высот клеток в пределах 95 % вариации, мкм	2,01 ± 0,10	0,78 ± 0,31*	1,73 ± 0,31**
Диаметр, мкм	7,81 ± 0,78	6,17 ± 1,02*	7,44 ± 2,34
Объем, мкм ³	66,02 ± 11,44	16,61 ± 8,20*	50,12 ± 13,20* **
Индекс объема	0,57 ± 0,03	0,22 ± 0,06*	0,56 ± 0,13**
Число пиков на 1 мкм ² поверхности, шт.	1,44 ± 0,75	1,23 ± 0,20*	0,12 ± 0,06*

Примечание: индекс объема — отношение объема клетки к площади ее поверхности.

Данные представлены в виде среднего выборочного и границы 95 % доверительного интервала (n = 8–10); *p < 0,05 по сравнению с контролем, ** p < 0,05 по сравнению с 3-ми сутками (t-критерий Стьюдента)

Заключение

1. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 1 Гр вызывает существенное снижение дыхательной активности тканей тимуса крыс, сохраняющееся вплоть до 10 суток после радиационной нагрузки.

2. Одновременно с этим наблюдается изменение морфологических характеристик тимоцитов: значительно уменьшается индекс объема кле-

ток, что свидетельствует об увеличении удельных обменных потоков между клеткой и окружающей ее средой. К 10-м суткам отмечается частичное восстановление морфологии тимоцитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Котенко, А. В. Радиационные аварии третьего тысячелетия в России (2000–2007 гг.) с развитием острых лучевых поражений / А. В. Котенков, А. Ю. Бушманов // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2008. — № 3 (23). — С. 39–48.

2. Кудряшов, Ю. Б. Основы радиационной биофизики / Ю. Б. Кудряшов, Б. С. Беренфельд. — М.: Московский университет, 1982. — 305 с.

3. Никитина, И. А. Количественная оценка клеточной пористости в АСМ-анализе / И. А. Никитина, А. Н. Никитин, А. И. Грицук // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст.

Республиканской научно-практической конф., посв. 20-летию Гомельского государственного медицинского университета. — Гомель: ГомГМУ. — 2011. — Т. 3. — С. 99–102.

4. Никитина, И. А. Особенности тканевого дыхания тимуса крыс в различные сроки после воздействия гамма-излучения / И. А. Никитина // Проблемы здоровья и экологии. — 2011. — № 1(27). — С. 102–106.

УДК 616.155.1+616.155.194

РОЛЬ АКВАПОРИН-ЗАВИСИМЫХ МЕМБРАНОТРАНСПОРТНЫХ МЕХАНИЗМОВ В РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ АНЕМИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Ж. В. Пешняк¹, Г. А. Шпак¹, Л. А. Смирнова², В. В. Рачицкая¹, А. Л. Трухан²,
Ю. В. Устинович¹, Е. М. Тумар¹, З. И. Кравчук¹

¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск
²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

Изучено участие аквапорина-1 (AQP-1) в регуляции структурно-метаболических свойств эритроцитов при анемиях различного генеза.

Установлено, что у пациентов с железodefицитной анемией (n = 6) наблюдается снижение скорости агрегации эритроцитов на 36 % по сравнению с контрольной группой (n = 12). Ингибирование AQP-1 и совместное подавление AQP-1 и фосфолипаза-зависимых мембранных механизмов приводит к повышению скорости агрегации эритроцитов до уровня в контрольной группе. Полученные результаты свидетельствуют об участии AQP-1 в регуляции структурно-функциональных свойств эритроцитов у пациентов с анемиями.

Ключевые слова: аквапорин-1, эритроциты, средний объем эритроцита, средняя концентрация гемоглобина, агрегационная активность эритроцитов, анемия.

ROLE OF AQUAPORIN-DEPENDENT MEMBRANE-TRANSPORT MECHANISMS IN THE REGULATION OF ERYTHROCYTE STRUCTURAL FUNCTIONAL CHARACTERISTICS IN ANEMIAS OF VARIOUS GENESIS

Zh. V. Peshnyak¹, G. A. Shpak¹, L. A. Smirnova², V. V. Rachitskaya¹,
A. L. Truhan², Yu. V. Ustinovich¹, E. M. Tumar¹, Z. I. Kravchuk¹

¹Republican Research Center for Hematology and Transfusiology, Minsk
²Belarussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk

The participation of aquaporin-1 (AQP-1) in the regulation of erythrocyte structural metabolic features in anemias of various genesis has been studied.

It has been ascertained that the patients with siderotic anemia (n = 6) have a 36 per cent decrease in the erythrocyte aggregation speed in comparison with the control group (n = 12). AQP-1 inhibition and AQP-1 combined suppression and phospholipase-dependent membrane mechanisms lead the increase in the erythrocyte aggregation speed till the level of the control group. The received results are evidence of AQP-1 participation in the regulation of erythrocyte structural metabolic features in the patients with anemias.

Key words: aquaporin-1, erythrocytes, mean corpuscular volume, mean hemoglobin concentration, erythrocyte aggregation activity, anemia.

Введение

С открытием в начале 1990-х американским гематологом Р. Агре в мембранах эритроцитов водно-специфического белкового транс-мембранного канала с молекулярной массой 28 кДа (названного впоследствии аквапорин-1 или AQP-1) существенно изменились представления о перемещении воды через клеточные мембраны [3]. В настоящее время активно изучается роль аквапоринов в газообмене и регуляции проницаемости мембран [2, 4]. AQP-1 эритроцитов участвуют в газообмене до 60 % углекислого газа

[5, 6] и обеспечивают до 100 % их водного обмена с внешней средой [2]. До сих пор мало изучены механизмы регуляции функциональной активности AQP-1 в эритроцитах. Практический интерес представляет также изучение роли AQP-1 в регуляции структурно-функционального статуса эритроцитов при анемическом синдроме [1].

Цель исследования

Изучение роли AQP-1 в регуляции структурно-метаболических свойств эритроцитов при анемиях различного генеза.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были эритроциты, выделенные из периферической крови 13 больных с анемиями различного генеза и 12 здоровых лиц (доноров крови).

Для оценки участия AQP-1 в регуляции функционально-метаболического состояния эритроцитов использовали метод ингибиторного анализа. Водный канал AQP-1 эритроцитов ингибировали хлоридом ртути в концентрации 10^{-6} М. Регуляторные ферменты фосфолипазы А2 ингибировали квинакрином в концентрации 10^{-4} М, а фосфолипазу С — неомицином в концентрации 10^{-2} М.

Цитогематометрические показатели крови определяли на гематологическом анализаторе Coulter Ac-T diff (Beckman Coulter, США). Оценивали средний объем эритроцита (MCV, фл), среднюю концентрацию гемоглобина (MCH, пкг) в эритроците и их соотношение (MCV/MCH, фл/пкг).

Показатели агрегационной активности эритроцитов (AAЭ) определяли турбидиметрическим методом с помощью анализатора агрегации клеток AP 2110 (ОАО «Солар», Беларусь). В качестве индуктора AAЭ использовали 0,05 %-ный раствор голубого альциана (Reanal, Венгрия). Анализировали степень агрегации (СтАЭ, %) и скорость агрегации эритроцитов (СкАЭ, %/мин).

Данные экспериментальных исследований были обработаны с использованием программного обеспечения MS «Excel» (Microsoft, USA). Одностороннюю вероятность сходства двух совокупностей определяли с помощью F-теста при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Анемия характеризуется снижением гемоглобина и гематокрита. Снижение концентрации гемоглобина в крови часто происходит при одновременном уменьшении количества эритроцитов и изменении их качественного состава. В связи с этим информативным является изменение таких показателей эритроцитов как MCV и MCH.

В результате оценки цитоморфометрических показателей установлено, что в группе пациентов с анемиями при лейкозах ($n = 5$) отмечалось повышение на 8,4 % ($p < 0,05$) среднего корпускулярного объема эритроцитов (MCV). У пациентов с гемолитической анемией ($n = 2$) выявлено статистически значимое повышение как MCV, так и MCH на 4,6 и 4,0 % соответст-

венно по отношению к показателям в контрольной группе у здоровых людей ($n = 12$). В группе пациентов с ЖДА не было выявлено отклонений в изучаемых показателях.

Ингибирование AQP-1 и фосфолипаза-зависимых механизмов существенно не влияло на цитоморфометрические показатели эритроцитов в обследуемых группах. Однако у пациентов с ЖДА при сочетанном ингибировании AQP-1 и фосфолипаз А2 и С выявлено снижение MCH ($27,5 \pm 1,4$ пкг, $p < 0,05$) при тенденции к снижению MCV ($80,9 \pm 2,8$ фл) по отношению к аналогичным показателям в контрольной группе ($30,6 \pm 0,4$ пкг и $86,6 \pm 1,0$ фл соответственно), соотношение MCV/MCH не изменялось.

В лабораторной диагностике анемий важны исследования AAЭ, поскольку повышение AAЭ приводит к усилению гипоксического воздействия на организм человека. Агрегация эритроцитов наступает под действием плазматических и гемодинамических факторов. Значительное влияние оказывают и собственно эритроцитарные факторы, одним из которых является величина отрицательного заряда на поверхности клеток, определяющая суспензионную стабильность крови, т. к. при его изменении увеличивается агрегационная активность эритроцитов. J. R. O'Brien (1962, 1966) при изучении строения мембраны эритроцита обнаружил агрегационный эффект у органического красителя голубого альциана (Alcian blue). Добавление голубого альциана к взвеси отмытых эритроцитов приводило к выраженной клеточной агрегации.

В таблице 1 представлены результаты влияния на AAЭ экспериментального подавления AQP-1-зависимых механизмов на фоне и при ингибировании фосфолипаз А2 и С в мембранах эритроцитов у гематологических пациентов с анемиями различного генеза *in vitro*.

В результате проведенных исследований выявлено нарушение AAЭ только в группе пациентов с ЖДА, выражавшееся в снижении СкАЭ на 36 % по отношению к показателям у здоровых людей ($p < 0,05$).

Ингибирование AQP-1 и совместное подавление AQP-1 и фосфолипаза-зависимых мембранных механизмов способствовало повышению СкАЭ в данной группе пациентов, после чего эти показатели не отличались от соответствующих значений в контрольной группе.

Таблица 1 — Влияние ингибирования AQP-1 и фосфолипаз А2 и С на агрегационную активность эритроцитов больных с анемиями различного генеза

Показатели	Без ингибирования фосфолипаз А2 и С		При ингибировании фосфолипаз А2 и С	
	контроль	10 мкМ HgCl ₂	контроль	10 мкМ HgCl ₂
	1	2	3	4
Группа I. Доноры (n = 12)				
СтАЭ, %	85,9 ± 2,0	81,5 ± 2,0	79,8 ± 3,0	78,4 ± 2,5
СкАЭ, %/мин	24,8 ± 2,4	26,3 ± 2,5	24,9 ± 2,0	27,9 ± 3,8*3

Окончание таблицы 1

Показатели	Без ингибирования фосфолипаз А2 и С		При ингибировании фосфолипаз А2 и С	
	контроль	10 мкМ HgCl ₂	контроль	10 мкМ HgCl ₂
	1	2	3	4
Группа II. Больные с анемиями при лейкозах (n = 5)				
СтАЭ, %	81,6 ± 4,5	77,4 ± 4,3	78,7 ± 4,8	74,6 ± 5,8
СкАЭ, %/мин	21,5 ± 2,1	22 ± 2,1	23,3 ± 6,3 Т I	20,7 ± 3,6
Группа III. Больные с железодефицитной анемией (n=6)				
СтАЭ, %	79 ± 3,5	85,2 ± 4,1	86 ± 3,7	87,8 ± 3,6
СкАЭ, %/мин	15,9 ± 1,3 * I	16,9 ± 2	18,9 ± 6,2*1,2 * I	17 ± 3,2 Т I
Группа IV. Больные с гемолитической анемией (n = 2)				
СтАЭ, %	90,6 ± 7,7	92,7 ± 3,7	92,3 ± 8,7	83,8 ± 9,9
СкАЭ, %/мин	20,8 ± 4,2	17,4 ± 2,8	26,8 ± 12,2	23,8 ± 0,8 Т3

Примечание. * — статистически значимые различия ($p < 0,05$); Т — тенденция к достоверности различий ($0,05 \leq p < 0,1$)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии трансмембранного канала AQP-1 в регуляции агрегационной активности эритроцитов у пациентов с железодефицитными анемиями.

Заключение

Установленные нами факты позволяют говорить об участии AQP-1 в регуляции структурно-функциональных свойств эритроцитов у пациентов с анемиями различного генеза. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методов фармакологической коррекции состояния мембраны эритроцита при анемиях.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Смирнова, Л. А. Анемии: диагностика, клиника, лечение: Монография / Л. А. Смирнова. — Минск: БГЭУ, 2002. — 98 с.
2. Титовец, Э. П. Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты / Э. П. Титовец. — Минск: Белорус. наука, 2007. — 239 с.
3. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel / P. Agre [et al.] // American Journal of Physiology. Renal Physiology. — 1993. — № 265. — P. 463–476.
4. Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine / P. Agre [et al.] // Journal of Physiology. — 2002. — № 542. — P. 3–16.
5. Blank, M. E. Aquaporin-1 and HCO₃-Cl-transporter-mediated transport of CO₂ across the human erythrocyte membrane / M. E. Blank, H. Ehmke // J. Physiol. — 2003. — № 550. — P. 419–429.
6. Endeward, V. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane / V. Endeward // FASEB J. — 2006. — Vol. 20, № 12. — P. 1974–1981.

УДК 616.155.194.76:614.876

ОСОБЕННОСТИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ МИЕЛОФИБРОЗЕ С МИЕЛОИДНОЙ МЕТАПЛАЗИЕЙ У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

И. Н. Прокопенко¹¹Научный центр радиационной медицины Академии медицинских наук Украины, г. Киев

Представлен анализ миелолипролиферативных характеристик 55 пациентов с радиационно-ассоциированным и 47 — со спонтанным миелофиброзом с миелоидной метаплазией. Учитывая индивидуальные дозы облучения, полученные в результате аварии на ЧАЭС, стадии заболевания, ожидаемую медиану дожития в 14-летнем интервале наблюдения, миелолипролиферативно-депрессивный индекс, выделены подгруппы хорошего, промежуточного и плохого прогноза течения заболевания, проведена оценка влияния ионизирующего излучения на миелопоэз в динамике течения заболевания.

Ключевые слова: миелофиброз с миелоидной метаплазией, ионизирующее излучение, миелолипролиферативный индекс.

MYELOPROLIFERATION FEATURES IN MYELOFIBROSIS WITH MYELOID METAPLASIA IN PERSONS, AFFECTED BY RADIATION AFTER CHERNOBYL DISASTER

I. N. Prokopenko¹¹Research Center for Radiation Medicine AMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

The analysis of myeloproliferative characteristics of 55 patients with radiation-associated myelofibrosis and 47 patients — with spontaneous myelofibrosis with myeloid metaplasia has been presented. Taking into account individual ra-

diation doses, absorbed after the Chernobyl Disaster, disease stages, expected living median in 14-year observation interval, myeloproliferation-depression index, subgroups of good, interim and bad prognosis for the disease course were singled out, the radiation affect on myelopoiesis in the dynamics of the disease course was assessed.

Key words: myelofibrosis with myeloid metaplasia, radiation, myeloproliferation index.

Введение

Влияние спектра ионизирующего излучения (ИИ) в диапазоне доз характерных Чернобыльской аварии 1986 г. интенсивно изучается учеными всего мира. Согласно данных Государственного регистра Украины, среди лиц с известными дозами облучения, 46,4 % участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС 1986–1987 гг. (УЛПА) получили дозы ниже 250 мЗв, у 5,6 % они превышали 250 мЗв. Для УЛПА 1989–1990 гг. лучевая нагрузка была меньше 50 мЗв. Для жителей радиационно загрязненных территорий (ЖРЗТ) сохраняется дополнительное влияние поглощенных доз облучения за счет инкорпорации радионуклидов, в т. ч. — остеотропных (⁸⁹Sr, ⁹⁰Sr) [1, 2]. В отдаленном периоде наблюдения актуальным является определение пороговых доз облучения, приводящих к патоморфологическим изменениям гемопоэза. Среди заболеваний, развитие которых ассоциировано с влиянием ИИ выделяют миелофиброз с миелоидной метаплазией (МММ), цитогенетические и молекулярные маркеры которого до конца не изучены. В патологический процесс МММ вовлечены генные мутации: JAK2^{V617F}, MPL^{W515}; нарушения цитокинового профиля: тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB), трансформирующий ростовой фактор В₁ (TGF В₁), эпидермальный фактор роста (EGF) и др., приводящие к избыточной пролиферации в костном мозге (КМ)

как кроветворных ростков, так и развитию вторичного ретикулинового и колагенового фиброза [4].

Цель исследования

Изучение миелопролиферативных характеристик у пациентов с МММ, облученных в результате аварии на ЧАЭС (1-я группа) и таковых у пациентов с МММ, не подвергавшихся воздействию доз аварийного спектра (2-я — контрольная группа) для оценки роли ИИ в патогенезе развития заболевания.

Материалы и методы исследования

Обследовано 102 пациента с МММ. В 1-ю группу вошли 44 пациента — УЛПА (0,51–49,0 сЗв.) и 11 пациентов ЖРЗТ (0,21 – 0,49 сЗв.). 2-ю группу составили 47 пациентов. Информацию об индивидуальных дозах облучения получали согласно данным дозиметрического обследования и ретроспективно-прогнозной дозиметрической паспортизации по месту проживания [2]. Достоверных отличий в поло-возрастных характеристиках пациентов 1 и 2 групп не было. Для оценки течения заболевания проводили рутинное клинико-гематологическое обследование, рассчитывали индекс, суммирующий базовые показатели миелопролиферации и миелодепрессии (МПДИ), предложенный ранее G. Varosi для оценки эффективности лечения МММ [6]. Прогностическая значимость МПДИ определяется суммой миелопролиферативного и миелодепрессивного индекса (МПИ и МДИ соответственно) в границах от 0 до 6 (таблица 1).

Таблица 1 — Оценка в баллах индексов миелопролиферации и миелодепрессии

Показатель	Баллы	Индекс	
		миелопролиферативный	миелодепрессивный
Размеры селезенки	0	Не пальпируется	
	1	Выступает до 10 см из-под реберной дуги	
	2	«-» более 10 см из-под реберной дуги	
Содержание гемоглобина в крови	0	≥ 120 г/л	
	1	от 100 до 120 г/л	
	2	< 100г/л	
Количество тромбоцитов	0	<500 × 10 ⁹ /л	>150 × 10 ⁹ /л
	1	≥500 × 10 ⁹ /л	≤150 × 10 ⁹ /л
Количество лейкоцитов	0	<15 × 10 ⁹ /л	≥4 × 10 ⁹ /л
	1	>15 × 10 ⁹ /л	<4 × 10 ⁹ /л

Выполняли оценку прогноза медианы выживаемости по Каплан-Майеру с учетом МПДИ. Результаты считали статистически значимыми при достоверности отличий по критерию Стьюдента меньше 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Верифицировали заболевание согласно диагностических критериев МММ принятых консенсусом Итальянской конференции 1998 г. [5]. С целью определения клинико-гематологических осо-

бенностей течения радиационно-ассоциированного МММ у пациентов 1-й группы, сравнительный анализ со спонтанным МММ у пациентов 2-й группы проводили с учетом стадии патологического процесса (таблица 2).

Для пациентов ЖРЗТ миелопролиферативные изменения были достоверно выраженные относительно таковых в группе контроля в начальной стадии МММ (согласно МПИ — $p < 0,01$, МДИ $p < 0,001$, МПДИ $p < 0,05$), и относительно таковых у УЛПА на ЧАЭС (согласно МПИ — $p < 0,05$, МДИ $p < 0,001$, МПДИ $p < 0,02$). Прогностическое значение МПДИ оценивали по таблицам дожития с расчетом медианы выживаемости в 14-летнем интервале наблюдения. Средняя сумма баллов МПДИ

в общей когорте составила $3,14 \pm 0,16$, разброс — 2–5, (сигма — 1,67). Для подгруппы хорошего прогноза МПДИ не превышал 2-х баллов, для промежуточного — от 3 до 5, для подгруппы с плохим прогнозом — 6 баллов (рисунок 1). В развернутой и терминальной стадии заболевания достоверных отличий индексов миелопролиферации не выявлено. Однако, анализ показателей дожития продемонстрировал, что у больных МММ с хорошим прогнозом ожидаемая медиана выживаемости в 14-летнем интервале наблюдения на конец периода составила 90 %, в группе промежуточного прогноза — 68 %, в то время как в подгруппе с плохим прогнозом достоверно отличалась уже на 4-м году наблюдения — 68 % и к 7-му году составила 10 %.

Таблица 2 — Оценка индексов миелопролиферации у пациентов с миелофиброзом с миелоидной метаплазией, подвергавшихся действию ионизирующего излучения в результате аварии на ЧАЭС в сравнении с группой контроля, согласно стадий заболевания ($M \pm m$)

Индекс / (исследуемая группа)	Оценка индексов миелопролиферации и (или) миелодепрессии		
	I стадия	II стадия	III стадия
МПИ (I)	$1,61 \pm 0,18$	$1,90 \pm 0,14$	$2,43 \pm 0,14$
МПИ (II)	$1,69 \pm 0,13$	$1,87 \pm 0,24$	$2,0 \pm 0,25$
МДИ (I)	$0,11 \pm 0,07$	$1,24 \pm 0,19$	$2,71 \pm 0,16$
МДИ (II)	$0,07 \pm 0,017$	$0,93 \pm 0,23$	$2,83 \pm 0,24$
МПДИ (I)	$1,72 \pm 0,19$	$3,09 \pm 0,24$	$5,14 \pm 0,23$
МПДИ (II)	$1,77 \pm 0,12$	$2,8 \pm 0,29$	$4,83 \pm 0,21$
МПИ (УЛПА)	$1,47 \pm 0,19$	$1,89 \pm 0,15$	$2,33 \pm 0,17$
МПИ (ЖРЗТ)	$2,33 \pm 0,33^*, **$	$2,2 \pm 0,12$	$2,6 \pm 0,24$
МДИ (УЛПА)	$0,06 \pm 0,046$	$1,21 \pm 0,21$	$2,78 \pm 0,22$
МДИ (ЖРЗТ)	$0,33 \pm 0,03^*, **$	$1,5 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,25$
МПДИ (УЛПА)	$1,53 \pm 0,19$	$3,05 \pm 0,25$	$5,11 \pm 0,31$
МПДИ (ЖРЗТ)	$2,67 \pm 0,33^*, **$	$3,50 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,37$

Примечание: * отличия достоверны для ЖРЗТ в сравнении с УЛПА; ** отличия достоверны для ЖРЗТ в сравнении со 2-й группой

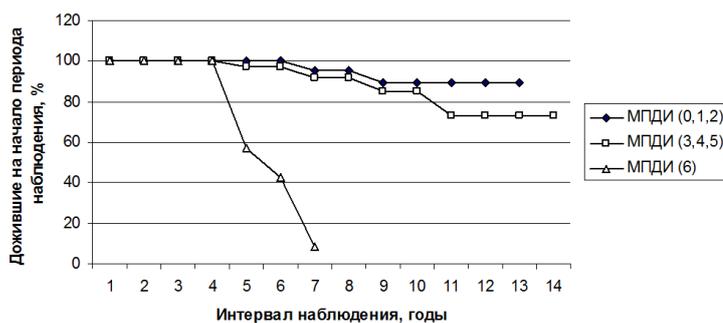


Рисунок 1 — Группы дожития (%) пациентов с МММ относительно МПДИ, с хорошим, промежуточным и плохим прогнозом

Полученные результаты соответствуют ранее выявленному в экспериментальных исследованиях повышенному содержанию PDGF-BB в образцах костного мозга а также более высокой клеточности гистоморфологических препаратов КМ у больных с радиационно-ассоци-

рованным МММ, в сравнении с группой спонтанного МММ, в начальной и развернутой стадиях заболевания [3].

Заключение

Отмечена высокая чувствительность МПДИ для оценки выживаемости при МММ, выделе-

ны подгруппы хорошего (до 2-х баллов), промежуточного (от 3 до 5) и плохого (6 баллов) прогноза течения заболевания. Выраженность миелолифолиферативных изменений согласно суммарных индексов миелолифолиерации и миелодепрессии у жителей радиационно загрязненных территорий, облученных в диапазоне низких доз (0,21–0,49 сЗв) была достоверно выше таковых у пациентов с МММ УЛПА и контрольной группы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Берковский, В. Б. Облучение населения за счет радионуклидов стронция и трансурановых элементов (ТУЭ). Дозы облучения населения Украины // в кн.: Эпидемиология медицинских последствий аварии на Чернобыльской АЭС / В. Б. Берковский; под

ред. В. А. Бузунова, И. А. Лихтарева. — Киев: МЕДЭКОЛ МНИЦ БИО-ЭКОС, 1999. — Кн. 2. — С. 38–39.

2. Ретроспективно-прогнозные дозы облучения населения за геномной дозиметричной паспортизацией 1997 г. населенных пунктов Украины, что назвали радиоактивного загрязнения вследствие Чернобыльской аварии / И. А. Лихтарев [и др.] // Збірка 7. — Київ, 1998. — 155 с.

3. Содержание тромбоцитарного фактора роста ВВ при миелофиброзе с миелоидной метаплазией у лиц, подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения / В. Г. Бебешко [и др.] // Онкология. — 2006. — Т. 8, № 3. — С. 250–254.

4. Detection of MPL exon10 mutations in 103 Chinese patients with JAK2V617F-negative myeloproliferative neoplasms / X. Chen [et al.] // Blood Cells Mol. Dis. — 2011. — Vol. 15, № 47(1). — P. 67–71.

5. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia / G. Barosi [et al.] // Br. J. Haematol. — 1999. — Vol. 104, № 730. — P. 37–45.

6. Thalidomide in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a pooled-analysis of individual patient data from 5 studies / G. Barosi [et al.] // Leuk Lymphoma. — 2002. — Vol. 43. — P. 2301–2307.

УДК 616.155.342:616.155.392-036.11

ОСТРЫЙ МИЕЛОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ, РАЗВИВШИЙСЯ ПОСЛЕ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ ИЛИ ПРИОБРЕТЕННОЙ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ

И. П. Ромашевская¹, Н. Н. Савва¹, Н. П. Литвинко², О. В. Алейникова²

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, г. Минск

²Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

В статье представлены 8 случаев вторичного острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) у больных, получивших лечение по поводу злокачественного новообразования (ЗН) или приобретенной апластической анемии (ПАА) в детском возрасте, и 40 случаев de novo ОМЛ группы высокого риска. Дискутируется клинико-лабораторная характеристика, терапия и выживаемость вторичного ОМЛ и de novo ОМЛ с учетом имеющихся на сегодняшний день литературных данных.

Ключевые слова: вторичный или терапией обусловленный ОМЛ, de novo ОМЛ, дети.

ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA DEVELOPING AFTER THE TREATMENT FOR MALIGNANT NEOPLASM OR APLASTIC ANEMIA ACQUIRED IN CHILDHOOD

I. P. Romashevskaya¹, N. N. Savva¹, N. P. Litvinko², O. V. Aleinikova²

¹Republican Research Centre for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

²Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel

The article presents 8 cases of secondary acute myeloblastic leukemia in patients, undergoing the treatment for a malignant neoplasm or aplastic anemia acquired in childhood and 40 cases of de novo acute myeloblastic leukemia of the high risk group. The clinical laboratory characteristics, therapy and survival rate of secondary acute myeloblastic leukemia and de novo acute myeloblastic leukemia have been discussed in the article with the account of the literary up-to-date data.

Key words: secondary acute myeloblastic leukemia or therapy-associated acute myeloblastic leukemia, de novo acute myeloblastic leukemia, children

Введение

Улучшение долгосрочной выживаемости больных ЗН, достигнутое путем внедрения эффективных протоколов лучевой терапии (ЛТ) и химиотерапии (ХТ), высветило наличие проблемы вторичных опухолей. При этом вторичные лейкозы в большинстве случаев представлены ОМЛ, индуцированным цитостатиками, радиацией и химическими мутагенами и воз-

никшими у больных другими формами гемобластозов, у лиц с другими опухолями и с неопухолевыми заболеваниями. В литературе данные по частоте вторичного ОМЛ варьируют от 1 % у детей до 27 % у взрослых [1, 2].

В статье представлена сравнительная характеристика вторичного ОМЛ у больных, получивших лечение по поводу ЗН или приобретенной апластической анемии (ПАА) в детском

возрасте в Республике Беларусь (РБ), и de novo ОМЛ, а также дискутируются результаты лечения и выживаемость с учетом имеющихся на сегодняшний день литературных данных.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 8 пациентов со вторичным ОМЛ, получавших терапию в период 2000–2008 гг. и 103 пациента с de novo ОМЛ, получавших терапию в этот же период времени (анализ популяционных данных Детского онкологического центра РБ). В соответствии с положениями протокола терапии ОМЛ-ММ-2000/2003 были выделены группы риска. Все пациенты со вторичным ОМЛ (100 %) и 38,8 % (40 пациентов) с de novo ОМЛ были включены в группу высокого риска ($p < 0,05$). В связи с этим был проведен сравнительный анализ клинико-лабораторных данных, лечения и выживаемости в этих группах.

Морфологическая линейная принадлежность бластных клеток оценивалась с использованием критериев ФАБ-классификации. Цитохимическое исследование включало реакции на миелопероксидазу (МПО), липиды, гликоген, неспецифическую эстеразу. Иммунологическая линейная принадлежность бластных клеток костного мозга (КМ) определялась методом проточной цитофлуориметрии; диагноз ОМЛ устанавливался согласно EGP-рекомендаций. Цитогенетический анализ проводился методом G-banding.

Результаты исследования и их обсуждение

Клинико-лабораторная характеристика. В группе de novo ОМЛ среди заболевших преобладали мальчики (60 %), статистически значимых различий не выявлено, $p = 0,24$. При сравнении возраста заболевших в группе de novo ОМЛ не выявлено каких-либо достоверных возрастных преобладающих, медиана возраста составила 7,7 лет. При сравнении клинических проявлений достоверных различий не выявлено ($p > 0,4$). По морфологической характеристике также не выявлено преобладания каких-либо FAB вариантов в группе de novo ОМЛ в сравнении со вторичным ОМЛ. При сравнении лабораторных показателей периферической крови были выявлены более высокие значения уровня лейкоцитов в группе de novo ОМЛ и не выявлены достоверные различия по количеству тромбоцитов и уровню гемоглобина ($p > 0,3$).

В этих группах нами изучены генетические особенности. В исследование были включены 7 пациентов со вторичным ОМЛ, поскольку 1 пациентка не была обследована ввиду досрочной летальности в условиях медучреждения областного центра. При анализе распределения хромосомных aberrаций обнаружено достоверное превышение выявления моносомии-7 при вторичном ОМЛ (42,9 %), статистически значимое ($p = 0,00001$). В группе de novo ОМЛ в 35 % случаев была отме-

чена aberrация 11q23 ($p = 0,06$) и в 37,5 % комплексные хромосомные aberrации ($p = 0,05$).

По данным литературы, для вторичного ОМЛ наиболее характерны комплексные нарушения кариотипа и гипоплоидия, а также достоверно чаще встречаются такие цитогенетические поломки, как моносомия 5 и 7, делеция — 7q, aberrации, вовлекающие — 17p, моносомия — 18 [1, 3, 6–10]. В качестве поломок, характерных вторичного ОМЛ описаны t(1;3), t(9;11), t(11;19), а также транслокации, вовлекающие 11q23 [6]. При этом моносомия 7 и/или комплексные цитогенетические aberrации определяют большинство смертей, связанных с вторичным ОМЛ. Наши данные абсолютно коррелируют с имеющимися в литературе.

Результаты лечения и исход. С целью анализа лечения пациентов со вторичным ОМЛ и de novo ОМЛ в дальнейшее исследование были включены 7 пациентов со вторичным ОМЛ, поскольку 1 пациентка умерла до начала специфического лечения, и 40 пациентов группы высокого риска de novo ОМЛ. Все пациенты получали лечение по программе ОМЛ-ММ-2000/2003.

Пациентам со вторичным ОМЛ чаще выполнялась трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), 71,4 % против 52,5 % пациентов с de novo ОМЛ ($p > 0,05$). Причем в случае выполнения ТГСК всем пациентам со вторичным ОМЛ выполнялась аллогенная ТГСК, в то время как в случаях с de novo ОМЛ — только в 23,8 % выполнялась аллогенная ТГСК, а в остальных случаях — аутологичная ТГСК.

При сравнительном анализе результатов лечения достижение полной ремиссии отмечено в более 80% случаев у пациентов обеих групп. У пациентов группы de novo ОМЛ в 54,6 % случаев развивался рецидив, причем в 10 случаях — после проведения ТГСК (9 — после аутоТГСК и 1 — после аллоТГСК). Достоверной разницы развития рецидива после проведения аллоТГСК в обеих группах не выявлено. При сравнительном анализе структуры летальности выявлен один случай (14,3 %) ранней смерти у пациентов со вторичным ОМЛ, у пациентов с de novo ОМЛ ранняя смерть случилась в 15 % ($p > 0,5$).

Больные вторичным ОМЛ имеют низкие показатели долгосрочной выживаемости (около 30 %), которые, в целом, ниже, чем при de novo ОМЛ у детей [13]. С другой стороны, довольно агрессивное противоопухолевое лечение первой опухоли в детском возрасте может затруднить достижение длительной ремиссии путем использования только химиотерапии, поэтому ставится вопрос о целесообразности проведения аллогенной ТГСК [14]. При этом надо иметь в виду, что по данным некоторых авторов, пациенты с хорошим соматическим статусом и от-

сутствием предшествующей ОМЛ фазы МДС имеют одинаковый с de novo ОМЛ шанс на излечение при соответствующем цитогенетическом риске. Кроме того, прогностическое сходство наблюдается, если пациенты дополнительно стратифицируются на основе таких факторов как морфология, иммунофенотипирование и профиль множественной лекарственной устойчивости [15, 16]. Отсутствие цитогенетических данных вносит определенные ограничения для стратификации и выбора правильной тактики лечения вторичного ОМЛ.

Заключение

Вторичный ОМЛ, развившийся после лечения как ЗН (в 2/3 случаев), так и ПАА в детском возрасте (у трети больных), чаще регистрировался у девочек. Наибольший процент заболевших вторичным ОМЛ наблюдался в возрастной категории от 3 до 10 лет. Медиана возраста при вторичном ОМЛ составила 7,5 лет против 11,0 лет при de novo ОМЛ. При сравнении клинических проявлений достоверных различий не выявлено. У большинства больных вторичным ОМЛ наблюдались М1-М2 типы по морфологии и аномалии хромосомы 7. Ремиссия была достигнута в 85,1 % случаев при использовании современного протокола лечения для de novo ОМЛ с использованием интенсивной двойной индукции, за наблюдаемый период рецидивов заболевания зафиксировано не было. Общая выживаемость для больных вторичным ОМЛ, получивших антилейкемическое лечение, составила 75 % с медианой наблюдения 42,5 мес. Однако окончательные выводы о выживаемости и эффективности терапии можно будет делать только по достижении длительных сроков наблюдения и анализе большей выборки пациентов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. The incidence of secondary leukemias / G. Leone [et al.] // Haematologica. — 1999. — Vol. 84. — P. 937–945.

2. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children treated for cancer: comparison with primary presentation / D. Barnard [et al.] // Blood. — 2002. — Vol. 100. — P. 427–434.

3. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence / G. Leone [et al.] // Haematologica. — 2007. — Vol. 92(10). — P. 1389–1398.

4. Acute myeloid leukemia in patients previously diagnosed with breast cancer: experience of the GIMEMA group / L. Pagano [et al.] // Annals of oncology. — 2001. — Vol. 12. — P. 203–207.

5. Risk of adverse events after completion of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia / C. H. Pui [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23. — P. 7936–7941.

6. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1974–2001 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974–2001 / N. Mauritzson [et al.] // Leukemia. — 2002. — Vol. 16. — P. 2366–2378.

7. Pedersen-Bjergaard, J. The balanced and unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation / J. Pedersen-Bjergaard, J. D. Rowley // Blood. — 1994. — Vol. 83. — P. 2780–2786.

8. Pedersen-Bjergaard, J. Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II / J. Pedersen-Bjergaard, P. Phillip // Blood. — 1991. — Vol. 78. — P. 1147–1148.

9. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting at DNA-topoisomerase II / H. J. Gilr [et al.] // Blood. — 1993. — Vol. 82. — P. 3705–3711.

10. Pedersen-Bjergaard, J. Two different classes of therapy-related and de novo acute myeloid leukemia? / J. Pedersen-Bjergaard, P. Philip // Cancer Genet. Cytogenet. — 1991. — Vol. 55. — P. 119–124.

11. Risk factors for evolutions of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after immunosuppressive therapy in children / S. Kojima [et al.] // Blood. — 2002. — Vol. 100. — P. 786–790.

12. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia / J. Pedersen-Bjergaard [et al.] // Leukemia. — 2008. — Vol. 22. — P. 240–248.

13. Secondary acute myeloid leukemia: results of conventional treatments: experience of GIMEMA trials / L. Pagano [et al.] // Annals of oncology. — 2005. — Vol. 16 (2). — P. 228–233.

14. Toxicity and outcome of children with treatment related acute myeloid leukemia / U. Tabori [et al.] // Pediatr Blood Cancer. — 2008. — Vol. 50. — P. 17–23.

15. Rowe, J. Therapy of secondary leukemia / J. Rowe [et al.] // Leukemia. — 2002. — Vol. 16. — P. 748–750.

16. Prognosis in therapy-related acute myeloid leukemia and impact of karyotype / W. Kern [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2004. — Vol. 22. — P. 2510–2511.

УДК 616.155.392

Н- И L-ФЕРРИТИНЫ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

Л. А. Смирнова¹, З. И. Кравчук², Ж. М. Козич²

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

²Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

Мы исследовали Н-и L-субъединицы ферритина при острых лейкозах. Наши данные позволяют предположить, что появление значительных количеств ферритина в сыворотке больных клональными заболеваниями крови связано с его секрецией лимфоцитами. Поскольку достоверных корреляций между объемом опухоли при лейкозах и уровнем ферритина определить невозможно, то гипотетически секреция ферритина связана с его регуляторными функциями. Нами показано, что раздельное определение L- и Н-форм ферритина позволяет определить состав ферритина сыворотки. Установлено, что состав сывороточного ферритина отличается при ОЛ в атаках и ремиссиях, но для понимания истинного диагностического значения Н-ферритина необходимо накопление данных. Возможно, что в недалеком будущем по составу ферритина сыворотки можно будет отличать гематологические синдромы при злокачественных опухолях, т. е. клональных процессах от синдромов, обусловленных воспалением.

Ключевые слова: ферритин, H-субъединица, L-субъединица.

H- AND L-FERRITINS IN ACUTE LEUKEMIA

L. A. Smirnova¹, Z. I. Kravchuk², Zh. M. Kozich²

¹Belarussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk

²Republican Research Centre for Radiation and Human Ecology, Gomel

We have studied H- and L-subunits of ferritin in acute leukemia. Our data makes it possible to suggest that the appearance of considerable numbers of ferritin in the serum of patients with clonal blood diseases is connected with its secretion with lymphocytes. As it is impossible to establish the reliable correlation between the dimension of the tumor in leukemia and the level of ferritin, then the ferritin secretion is hypothetically relating to its regulatory functions. We have shown that the separate testing of H- and L-forms of ferritin makes it possible to determine the content of serum ferritin. It has been established that the content of serum ferritin differs in acute leukemia at attacks and remission but it is necessary to accumulate the data for the comprehension of true diagnostic H-ferritin value. It is possible that in the nearest future hematologic syndromes in malignant tumors, i.e. clonal processes from the inflammation-associated syndromes, can be differentiated according to the content of serum ferritin.

Key words: ferritin, H-subunit, L-subunit.

Ферритин — белок, который накапливает и хранит в организме железо в нетоксической и биологически доступной форме. Ферритин состоит из 24 субъединиц, представленных двумя типами цепей: H-тяжелой цепью и L-легкой, находящиеся в различном соотношении в зависимости от ткани, кодируемые разными генами. В ряде работ указывается на то, что у здоровых уровень H-субъединиц в сыворотке значительно ниже, чем L-субъединиц. В циркуляции L-субъединица представлена в основном его гликозилированной формой [3]. Согласно последним данным, H-ферритин участвует в регуляции клеточной пролиферации и гемопоэза (Recalcati et al., 2008). При этом H-ферритин способен вызывать эффективную гибель пролиферирующих клеток по механизму радикальных процессов. Особое значение имеет тот факт, что цитотоксические механизмы активируются через усиленную продукцию именно H-ферритина, а не его L-изоформы, которая связана, преимущественно, с процессами депонирования железа. Однако опубликованные в настоящее время данные носят разрозненный характер, и окончательного ответа на вопрос о причинах аномально высокого содержания ферритина при онкологических процессах, его происхождении и роли не получено [4].

Цель исследования

Определение содержания H- и L-ферритинов при различных видах лейкозов, исследование соотношения H и L ферритинов, установление связи с характером лейкоемического процесса.

Материал и методы исследования

На первом этапе были исследованы ферритины в сыворотках доноров методом иммуноферментного анализа, отечественными наборами «ИФА-H-Ферритин» для исследования H-формы и «ИФА-Ферритин» — для исследования L-формы. Содержание L-ферритина у здоровых доноров без учета пола составило 77,42 ±

5,31 мкг/л (n = 50), уровень H-ферритина у доноров (n = 30) для здоровых лиц (без учета пола) составил 9,85 ± 2,11 мкг/л. Нами была проведена корреляция между L- и H-формами ферритина у доноров, коэффициент корреляции составил 0,92 (p < 0,05). Раздельное определение H- и L-ферритинов, осуществляемое с помощью разработанных отечественных наборов, позволяет определить состав ферритина сыворотки при любой патологии. Для этого мы предлагаем показатель, представляющий собой соотношение H- и L-субъединиц (показатель H/L).

Величина соотношения H/L-субъединиц в сыворотках доноров лежит в пределах от 0,1 до 0,3, средняя величина соответственно составляет 0,21 ± 0,06.

Ранее было показано, что уровень сывороточного ферритина (L-форма) не отражает линейную принадлежность опухолевого клона при ОЛ [1], поэтому мы не делили группу на острые миелоидные и лимфоидные лейкозы. При атаках ОЛ (n = 49) установлен уровень L-ферритина 1876,9 ± 169,2 при содержании H-формы 273,2 ± 27,7 мкг/л. Соотношение H/L-субъединиц равно 0,14 ± 0,03. В предыдущих работах было установлено [2], что прогностическое значение при острых лейкозах имеет величина исходного показателя L-ферритина, при его уровне > 2000 мкг/л предполагается неблагоприятный прогноз. На основании этого из группы леченных больных мы отобрали пациентов первично резистентных к терапии, в эту группу попали 14 больных с острым миелобластным лейкозом, уровень L-ферритина оказался 3265,0 ± 582,5 мкг/л, H-формы соответственно 250,9 ± 89,9 мкг/л, соотношение H/L-субъединиц равно 0,07, что свидетельствует о значительном нарушении структуры молекулы ферритина. Далее мы исследовали 11 больных в ремиссии ОЛ. Было установлено, что выявленная гиперферритинемия достоверно и значительно сни-

зилась по L-форме и составила $432,7 \pm 72,3$ мкг/л; уровень H-ферритина соответственно составил $63,7 \pm 4,8$ мкг/л. Различия по H-ферритину при атаках и ремиссиях ОЛ недостоверны. Острый лейкоз является моделью быстро пролиферирующей опухоли кроветворной системы. В качестве модели медленно пролиферирующей лимфоидной опухоли нами исследованы сыворотки больных с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) в стадии В. При ХЛЛ ($n = 6$) уровень L-ферритина составил $192,8 \pm 49,21$ мкг/л, H-ферритин — $28,4 \pm 3,2$ мкг/л. Показатели ферритина для исследованных больных с ХЛЛ достоверно отличаются от аналогичных донорских показателей по L-ферритину. При ХЛЛ соотношение H/L также лежит в пределах данных значений у доноров: $0,14 \pm 0,02$.

При множественной миеломе (также В-клеточная опухоль), II A стадия, ($n = 8$) уровень L-ферритина составил $1160,7$ г/л, H-ферритин — $97,6$ мкг/л, соотношение H/L равно $0,09$, т. е. уменьшено по отношению к донорскому аналогичному показателю.

В качестве заболевания крови с низким уровнем прогрессии, с большой продолжительностью жизни, приближающейся к таковой в общей популяции, исследована эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ). В группе больных ЭТ (пример медленно пролиферирующей миелоидной опухоли крови) уровень L-ферритина сыворотки составил $84,72 \pm 9,67$ мкг/л. Группа включала больных обоего пола, у которых полученные величины сывороточного ферритина лежали в пределах от $23,5$ до $158,2$ мкг/л. Различия статистически достоверны ($p < 0,01$). В то же время показатели L-ферритина, полученные у больных ЭТ, лежат внутри референтных значений L-ферритина ($20-200$ мкг/л) для здоровых доноров. Уровень H-ферритина в группе

больных с ЭТ ($n = 31$) составил $8,84 \pm 1,42$ мкг/л (минимальные и максимальные величины соответственно составили $4,1-14,05$ мкг/л), соотношение H/L также лежит в пределах донорских значений данного соотношения: $0,11 \pm 0,02$, что является косвенным подтверждением того, что при ЭТ секретируется нормальный по составу ферритин.

Изучение содержания H- и L-форм ферритина, соотношения H/L при различных нозологиях, включая солидные опухоли, позволит объективно оценить информативность предложенного показателя. Представленные данные носят в некоторой степени предварительный характер, поскольку в настоящее время идет накопление новых знаний по содержанию и составу ферритинов, тем не менее уже можно сделать ряд **выводов**:

1) при лейкозах отмечается гиперферритинемия как по L-форме, так и по H-форме. Степень гиперферритинемии связана с характером лейкозного процесса и стадией заболевания;

2) показано, что раздельное определение L- и H-форм ферритина позволяет определить состав ферритина сыворотки при различных нозологиях. Установлено, что состав ферритина отличается у доноров, при ОЛ в атаках и ремиссиях, хроническом лимфоидном лейкозе, множественной миеломе, эссенциальной тромбоцитемии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Смирнова, Л. А. Ферропротеины при лейкозах и анемиях: патогенетическое, диагностическое, прогностическое значение: автореферат дис. ... д-ра мед. наук / Л. А. Смирнова. — Минск, 2005.
2. Смирнова, Л. А. Изменения в системе ферропротеинов при острых лейкозах / Л. А. Смирнова, А. И. Свириновский // Мед. новости. — 2003. — № 6. — С. 12–15.
3. Arosio, P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more / P. Arosio, R. Ingrassia, P. Cavadini // Biochim Biophys Acta. — 2008. — Vol. 10.
4. Cell Biology and Metabolism. Bridges Ascorbic Acid Enhances Iron-induced Ferritin Translation in Human Leukemia and Hepatoma Cells / Ildiko Toth [et al.]. // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 2846–2852.

УДК 616.438

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОДБОРА ДОНОРА ДЛЯ НЕРОДСТВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

А. Ю. Старцева, Е. А. Янушевская, А. Л. Усс, С. И. Кривенко

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В случаях отсутствия HLA-совместимого родственного донора прибегают к поиску неродственного донора в базах данных международных и национальных регистров доноров гемопоэтических стволовых клеток. В 2009 г. в г. Минске создан Минский городской регистр доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, который в настоящее время содержит данные более чем 3,5 тысяч охарактеризованных по HLA-фенотипу доноров. В 2010 г. на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» организована лаборатория HLA-типирования, основными задачами которой являются типирование доноров для Минского городского регистра доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, а также подбор пар донор-реципиент для аллогенной трансплантации. Перспективной задачей является аккредитация лаборатории HLA-типирования Европейской федерацией иммуногенетики (EFI) и включение данных национального регистра в базу данных Международного регистра доноров (IBMTR).

Ключевые слова: аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, HLA-фенотип, регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток, HLA-типирование.

PRACTICAL ASPECTS FOR DONOR SELECTION FOR UNRELATED TRANSPLANTATION OF HEMOPOIETIC STEM CELLS

A. Yu. Startseva, E. A. Yanushevskaya, A. L. Uss, S. I. Krivenko

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

In cases when there is no HLA-compatible related donor, an unrelated donor is searched for in the data bases of international and national registers of donors for hemopoietic stem cells. The Minsk Municipal Register of donors for marrow and hemopoietic stem cells was founded in 2009. At present it contains the data on more than 3,5 thousand donors described by HLA-phenotype. The HLA-typing Laboratory was organized in 2010 in Municipal Clinical Hospital № 9. Its main tasks are donor typing for Minsk Municipal register of donors for marrow and hemopoietic stem cells and to select pairs of donor-recipient for allogeneic transplantation. Accreditation of HLA-typing Laboratory by European Federation of Immunogenetics and including of the national register into the IBMTR data base are a prospective goal.

Key words: allogeneic transplantation of hemopoietic stem cells, HLA-phenotype, register of donors for hemopoietic stem cells, HLA-typing.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является признанным и, в некоторых ситуациях, единственным эффективным методом терапии онкогематологических заболеваний и ряда других состояний, связанных с дефицитом кроветворения и иммуногенеза [1].

В клинической практике в качестве источника ГСК используют костный мозг, периферическую и пуповинную кровь. При применении в качестве лечебной технологии аллогенной трансплантации ГСК одной из важнейших задач, во многом определяющей эффективность терапии, является подбор пар донор-реципиент. В качестве донора гемопоэтической ткани при родственных трансплантациях, как правило, выступают брат или сестра (существенно реже — один из родителей) [2].

Серьезным фактором, ограничивающим применение аллогенной трансплантации ГСК, является отсутствие HLA-совместимого родственного донора. Вероятность совпадения фенотипов родственных донора и реципиента не превышает 25 %. В этих случаях прибегают к поиску неродственного донора с использованием баз данных международных и национальных регистров доноров гемопоэтических стволовых клеток, успешно функционирующих в странах Северной Америки и Евросоюза. Для подбора совместимого по HLA фенотипу донора с вероятностью 40–50 % для пациентов европейского происхождения регистр доноров должен насчитывать не менее 200 тыс. европейцев [3].

Данные регистры представляют собой компьютеризированные списки доноров, полностью или частично охарактеризованные по HLA-фенотипу. Основная масса лиц, входящих в регистры, является донорами крови и ее компонентов, находящимися на учете в банках крови и станциях переливания крови [1].

Выбор донора основывается на сравнении HLA-фенотипов донора и реципиента. Для ус-

пешной аллогенной трансплантации ГСК неродственный донор должен совпадать с реципиентом по всем антигенам 5 HLA-локусов (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ). При подборе также учитывается возраст, пол, группа крови, резус, CMV-статус донора [6]. Донор и реципиент, совпадающие по всем 10 антигенам этих локусов, считаются полностью совместимыми. При наличии различий по одному или нескольким антигенам пара рассматривается как имеющая несовместимости [1].

Для идентификации HLA-фенотипа используются серологический и молекулярный методы типирования. Серологическое типирование существенно дешевле по стоимости и долгое время было единственным методом исследования. Поэтому многие потенциальные доноры национальных и международных регистров охарактеризованы только A, B и DR локусам. Например, в Национальном регистре США, включающем около 4 млн человек, лишь половина потенциальных доноров типированы по всем 6 антигенам. В настоящее время большинство регистров перешло на молекулярно-генетические методы типирования, поскольку эти исследования позволяют определить HLA-фенотип как на низком, так и на высоком разрешении [4].

Проведение высокоразрешающего HLA-типирования позволяет существенно повысить выживаемость пациентов после аллогенной трансплантации, что было убедительно доказано при анализе данных 3857 трансплантаций, выполненных с 1988 по 2003 гг. в Соединенных Штатах. Пары пациент-донор были типированы молекулярно-генетическим методом по HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1 и -DPA1 аллелям. Высокий уровень совпадений по HLA-A, -B, -C, и -DRB1 (8/8 совпадений) ассоциировался с более высокой выживаемостью групп больных. Хотя бы одно несоответствие по HLA-

A,-B,-C или -DRB1 (7/8 совпадений) ассоциировалось с более высокой летальностью, и, соответственно, 1-летняя выживаемость в данной группе пациентов составила 43 % по сравнению с 52 % для пациентов с 8/8 совпадений по фенотипам. Несовпадения по HLA-B или HLA-C считаются более предпочтительными для аллогенной трансплантации, чем несоответствия в HLA-A и HLA-DRB1. Несовпадение в двух или более локусах представляет реальный риск развития тяжелых осложнений. В мультивариантном моделировании возраст пациента, раса, стадия болезни, и CMV статус были столь же важными прогностическими факторами выживаемости, как и соответствие по HLA-фенотипу [5].

В 2009 г. в г. Минске создан Минский городской регистр доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток. В настоящее время он содержит данные более чем 3,5 тысяч охарактеризованных по HLA-фенотипу доноров, подписавших форму информированного согласия.

В 2010 г. на базе 9-й городской клинической больницы организована лаборатория HLA-типирования, основными задачами которой являются типирование доноров для Минского городского регистра доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, а также подбор пар донор-реципиент для аллогенной трансплантации. Также лаборатория проводит определение антигена HLA-B27 при генетически детерминированных заболеваниях (болезнь Бехтерева, ревматоидный артрит) и исследование HLA-фенотипов супружеских пар для диагностики случаев бесплодия.

В практической деятельности лаборатории применяются следующие методы типирования —

серологический (двухступенчатый тест комплексообразующей микролимфоцитотоксичности) и молекулярно-генетический (низко- и высокоразрешающее ДНК-типирование) с использованием ПЦР-SSO (sequence-specific oligonucleotide) и — SSP (sequence-specific primer) технологий. За время работы лабораторией HLA-типирования было выполнено более 700 молекулярно-генетических и 800 серологических исследований. В текущем году планируется увеличение количества типирований для Минского городского регистра и организация на его базе Республиканского регистра доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток. Перспективной задачей является аккредитация лаборатории HLA-типирования Европейской федерацией иммуногенетики (EFI) и включение данных национального регистра в базу данных Международного регистра доноров (IBMTR).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Зарецкая, Ю. М. HLA. 50 лет: 1958–2008 / Ю. М. Зарецкая, Ю. А. Леднев. — Трида, 2008.
2. Donor selection process for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation at the university hospital of Düsseldorf (1997–1998) / J. Enczmann [et al.] // Bone Marrow Donor Center with Eurocord Bank and Transplantation Immunology, Heinrich Heine University Medical Center, Düsseldorf, Germany.
3. Hematopoietic Stem Cell Transplantation / M. Hert [et al.] // Blood. — 2006. — Vol. 15. — P. 32–40.
4. Hematopoietic Stem Cell Transplantation // V. Samavedi [et al.] // Blood. — 2007. — Vol. 45. — P. 26–28.
5. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation / S. J. Lee [et al.] // Blood. — 2007. — Vol. 110(13). — P. 4576–4583.
6. The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure / S. Spellman [et al.] // Blood. — 2010. — Vol. 115, № 13. — P. 132–140.

УДК 616.155.342:616.155.392-036.11-08

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОКОЛА FLAG

Н. Н. Третьяк, Н. В. Горьяинова, Е. А. Киселева, А. И. Коваль, М. Ю. Аношина, О. В. Басова, А. М. Вакульчук, Т. П. Перехрестенко, В. Н. Мнищенко

Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины, г. Киев

В статье представлены собственные результаты лечения 54 пациентов с впервые выявленными и резистентными формами острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) с использованием флударабинсодержащего протокола FLAG. Показано, что применение указанной схемы химиотерапии является высокоэффективным и позволяет добиться ремиссии у большинства пациентов.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, лечение, эффективность.

FLAG PROTOCOL-BASED CURE RATE OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA

N. N. Tretyak, N. V. Goryainova, E. A. Kiseliova, A. I. Koval, M. Yu. Anoshina, O. V. Basova, A. M. Vakulchuk, T. P. Perehrestenko, V. N. Mnishenko

Institute of Haematology and Transfusiology AMS Ukraine, Kiev

The article presents the results of our own fludarabin-containing FLAG protocol-based treatment of 54 patients with both first detected and resistant forms of acute myeloid leukemia. It has been shown that, the application of the indicated chemotherapy scheme is highly effective and makes it possible to assure remission in most patients.

Key words: acute myeloid leukemia, treatment, cure rate.

Введение

Одним из эффективных и важных препаратов для лечения многих злокачественных заболеваний системы крови ОМЛ, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), миелодиспластического синдрома (МДС) и хронического миелолейкоза (ХМЛ) является цитарабин (Ага-С). Внедрение в практику химиотерапевтических режимов, содержащих высокодозированный Ага-С, привело к существенному улучшению результатов лечения, особенно у пациентов с ОМЛ [5].

Для реализации эффекта Ага-С должен быть внутри клетки фосфорилирован до трифосфата (Ага-СТР). За этот этап метаболизма Ага-С отвечает фермент дезоксцитидинкиназа. Снижение активности фермента ведет к уменьшению фосфорилирования Ага-С и потере цитостатической активности, что является одним из важнейших механизмов формирования резистентности лейкоэмических клеток в отношении цитарабина. Важно учитывать и тот факт, что естественная активность дезоксцитидинкиназы, которая в норме участвует в метаболизме физиологических нуклеотидов, лимитирована, что принципиально ограничивает возможности эскалации доз Ага-С в терапевтических целях [6].

Установлено, что флуларабин способен усиливать процессы внутриклеточного фосфорилирования Ага-С, в связи с чем было предложено включать флуларабин в схемы лечения при резистентности бластных клеток к цитозару. Встраивание молекул флуларабина в ДНК приводит к эффективному нарушению ее синтеза вследствие блокирования активности рибонуклеазы, ДНК-примазы, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. Возможным механизмом действия на покоящиеся клетки является (доказанный среди аналогов пуринов только для флуларабина)

на) феномен встраивания в рибонуклеиновые кислоты (РНК) с нарушением РНК-синтеза [2, 3]. Ингибирующее действие флуларабина на фермент рибонуклеотидредуктазу приводит к снижению внутриклеточной концентрации физиологических нуклеотидов, что способствует переориентации активности фермента дезоксцитидинкиназы и усилению фосфорилирования не только флуларабина (self-potential), но и Ага-С с повышением их внутриклеточной активности [7]. Исследования *in vitro* показали, что, помимо названного выше опосредованного пути, флуларабин способен напрямую повышать уровень фосфорилирования цитарабина [3, 4]. Флуларабин выступает также потенциальным синергистом благодаря способности блокировать механизмы репарации ДНК [9, 10]. Дополнительное назначение Г-КСФ также может способствовать усилению противоопухолевого действия. Реальной основой для этого предположения считается способность Г-КСФ переводить лейкоэмические клетки из фазы покоя в фазу синтеза [1, 9].

Цель

Изучить эффективность программы FLAG в индукционной терапии больных острым миелобластным лейкозом.

Материал и методы исследования

Учитывая все вышеизложенное, в отделении заболеваний системы крови ДУ «ИГТ АМНУ» за период с декабря 2003 по март 2011 гг. индукция ремиссии по протоколу FLAG была проведена 54 пациентам (29 мужчин, 25 женщин): 30 больных с впервые выявленным (манифестным) ОМЛ (М4), отнесенных к неблагоприятной группе прогноза, 24 больных — с первично-резистентной формой ОМЛ или ранними рецидивами (таблица 1).

Таблица 1 — Клиническая характеристика больных острым миелобластным лейкозом до начала лечения

Клинические показатели	Количество пациентов с указанными признаками, n
Пол:	
— мужчины	29
— женщины	25
Лимфоаденопатия	8
Гепатоспленомегалия	15
Лейкопения менее $3 \times 10^9/\text{л}$	17
Лейкоцитоз свыше $30 \times 10^9/\text{л}$	16
Геморрагический синдром	20
Анемия	29

Согласно ФАБ-классификации имелись следующие варианты ОМЛ: М2 — 14 случая, М4 — 26 случаев, М5 — 14 случаев.

Протокол FLAG (проводится 1 или 2 курса через 3 недели):

— флударабин 30 мг/м²/сут в/в 30-минутной инфузией 1–5 дни;

— цитарабин 2–3 г/м²/сут в/в 4-х-часовой инфузией 1–5 дни (через 4 часа после флударабина);

— Г-КСФ за день до начала ХТ в дозе 5 мкг/кг или в первые дни после окончания курса химиотерапии п/к ежедневно до восстановления гемопоэза и нормализации нейтрофилов в периферической крови.

Консолидация ремиссии:

1-й курс (через 4–6 недель):

— идарубин — 12 мг/м²/сут в/в 30-минутной инфузией 1, 2-й дни;

— флударабин — 25 мг/м²/сут в/в 30-минутной инфузией 1–5-й дни;

— цитозар — 2000 мг/м²/сут в/в 4-х-часовой инфузией 1–2-й дни (через 4 часа после флударабина);

2-й курс (через 4–6 недель):

— этопозид — 75 мг/м²/сут в/в 60-минутной инфузией 1–5-й дни;

— флударабин — 25 мг/м²/сут в/в 30-минутной инфузией 1–5-й дни;

— цитозар — 2000 мг/м²/сут в/в 4-х-часовой инфузией 1–2-й дни (через 4 часа после флударабина).

Поддерживающая терапия при применении программы FLAG (всего 8–12 курсов каждые 1,5–2 месяца):

— флударабин — 25 мг/м²/сут в/в 2-х-часовой инфузией 1–3 дни;

— цитозар — 100 мг/м²/сут 1–5 дни.

Результаты и их обсуждение

После завершения курсов ХТ FLAG у 39 из 54 (72 %) больных достигнута полная клинико-гематологическая ремиссия (у 36 из 39 человек после завершения 1-го курса).

Смертельный исход констатирован в 9 случаях. Пятеро пациентов с первично-резистентным течением ОМЛ (3 — М2, 2 — М4 и 4 — М5 морфологические варианты) не ответили на проведенную ХТ и погибли от дальнейшего прогрессирования

заболевания. 4 из 9 пациентов были с впервые установленным диагнозом (2 — М2, 2 — М4).

Во время проведения курсов ХТ FLAG больные отмечали удовлетворительное самочувствие, незначительные явления диспепсии, в некоторых случаях (40 %) лучшую переносимость по сравнению с курсами «7+3».

После завершения курсов гематологическая токсичность III степени наблюдалась у 14 пациентов, IV степени — у 36, длительность нейтропении у всех пациентов не превышала 3 недели. Период постцитостатической аплазии протекал с тяжелыми инфекционно-воспалительными осложнениями у 24 больных.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что протокол химиотерапии FLAG в лечении больных с ОМЛ является высокоэффективным и удовлетворительно переносимым пациентами. Применение указанной схемы лечения позволяет добиться ремиссии у большинства (72 %) пациентов. Наши наблюдения в этом направлении продолжаются.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics studies of fludarabine and cytosine arabinoside administered as loading boluses followed by continuous infusion / V. I. Avramis [et al.] // The Children Cancer Group. Clin. Cancer Res. — 1998. — Vol. 4(1). — P. 45–52.
2. Cortes, J. E. Defining the optimal dose schedule of purine analogs and assessment of response / J. E. Cortes, S. M. O'Brien; ed.: B. D. Cheson [et al.]. // Nucleoside analogs in cancer therapy. — New York: Marcel Dekker, Inc. — 1997. — P. 175–200.
3. Gandhi, V. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine / V. Gandhi, W. Plunkett // Clin. Pharmacokinet. — 2002. — Vol. 41. — P. 93–103.
4. Combination of fludarabine and arabinosylcytosine for the treatment of chronic lymphocytic leukemia: clinical efficacy and modulation of arabinosylcytosine pharmacology / V. Gandhi [et al.] // Cancer Chem. Pharmacol. — 1994. — Vol. 34. — P. 30–36.
5. Grant, S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology / S. Grant // Adv. Cancer Res. — 1998. — Vol. 72. — P. 197–233.
6. Fludarabine in low-grade lymphoma / A. Pigaditou [et al.] // Semin. Oncol. — 1993. — Vol. 20, № 7. — P. 24–27.
7. Plunkett, W. Metabolism and action of fludarabine phosphate / W. Plunkett, P. Huang, V. Gandhi // Semin. Oncol. — 1990. — Vol. 17, № 8. — P. 3–17.
8. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-D-arabinosyl-2-fluoroadenine / L. E. Robertson [et al.] // Blood. — 1993. — Vol. 81. — P. 143–150.
9. Fludarabine plus doxorubicin in previously treated chronic lymphocytic leukemia / L. E. Robertson [et al.] // Leukemia. — 1995. — Vol. 9. — P. 943–945.
10. Fludarabine and epirubicin in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a German multicenter phase II study / M. J. Rummel [et al.] // Ann. Oncol. — 1999. — Vol. 10. — P. 183–188.

УДК 616.15 (476)

СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

А. Л. Усс, В. С. Кушниренко, Н. Ф. Миланович

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В статье приведены результаты анализа качества оказания специализированной медицинской помощи пациентам с заболеваниями системы кроветворения в Республике Беларусь. Описана структура гематологи-

ческой службы, оснащенность коечным фондом, врачами-специалистами, лабораторным оборудованием. Результаты анализа выявили необходимость проведения реструктуризации службы. Определены перспективы развития, даны конкретные предложения по оптимизации структуры службы с целью повышения качества и доступности медицинской помощи пациентам с патологией системы кроветворения, внедрения современных технологий лечения.

Ключевые слова: медицинская помощь, стационарная помощь, амбулаторно-консультативная помощь, гематологическая служба.

STATE AND PROSPECTS OF THE HEMATOLOGICAL SERVICE IN THE REPUBLIC OF BELARUS

A. L. Uss, V. S. Kushnirenko, N. F. Milanovich

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

The article presents the results in the analysis of the quality of specialized medical assistance to patients with hemopoietic diseases in the Republic of Belarus. The structure of the hematological service, availability with bed fund, specialists, laboratory equipment have been described. The results of the analysis revealed the necessity to perform the restructuring of the service. To improve quality and accessibility of the medical assistance to the patients with hemopoietic pathology and to introduce up-to-date treatment technologies, the prospects for the development have been determined, concrete suggestions to optimize the structure of the service have been given.

Key words: medical assistance, in-patient care, out-patient consultation care, hematological service.

Структура гематологической службы Республики Беларусь сформирована по территориальному принципу на многоуровневой основе и охватывает все этапы оказания медицинской помощи: межрайонный, областной (городской), республиканский. В 11 районных центрах организованы консультативные приемы врачей-гематологов. В 7 районных центрах в составе отделений терапевтического профиля ЦРБ имеются гематологические койки, где оказывается посиндромная и паллиативная медицинская помощь больным с заболеваниями крови. На областном уровне стационарная помощь оказывается в гематологических отделениях областных больниц, УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска, ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (РНПЦ РМиЭЧ) — г. Гомель. Амбулаторно-консультативная помощь оказывается в консультативных гематологических кабинетах областных больниц и Минского консультативно-диагностического центра (МКДЦ). Головным учреждением службы является ГУ «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии» (РНПЦ ГиТ), не имеющий в своем составе коечного фонда и кабинетов амбулаторного приема больных. РНПЦ ГиТ осуществляет методическое руководство службой крови, планирует и проводит научные исследования в области гематологии.

Стационарное лечение взрослых гематологических больных в регионах республики осуществляется на 423 гематологических койках, из них в составе терапевтических отделений находятся 66 коек (15,6 %). Показатель обеспеченности гематологическими койками в 2010 г. составил 0,55 на 10 тыс. населения. Отмечаются

значительные различия в обеспеченности гематологическими койками различных регионов. Так в Могилевской области показатель достигает 0,74 коек на 10 тыс., в то время как в Минской области — всего 0,38. В составе ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», УЗ «9-я ГКБ» г. Минска и областных гематологических отделений (за исключением Гродненской и Брестской областей), организованы дневные стационары. Из общего коечного фонда гематологической службы (423 коек) на койки дневного стационара приходится 5,5 % (23 койки). В г. Минске этот показатель достигает 16 % (12 коек из 78), где лечение получают до 50 % от всех больных с заболеваниями крови (ежедневно от 60 до 110 больных).

К достижениям службы следует отнести возможность проведения на межрайонном уровне таких исследований, как исследование стерильного пунктата (морфология и цитохимическое исследование), обмен железа, протейнограмма, коагулограмма (АЧП, протромбиновое время, фибриноген, МНО). Это укорачивает сроки верификации диагноза и, соответственно, улучшает прогноз заболевания. В УЗ «9-я ГКБ» г. Минска, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» и ряде областных клиник в практику внедрены высокотехнологичные методы лабораторного обследования. Вместе с тем, не вызывает сомнения низкая эффективность выполнения специализированных лабораторных исследований на межрайонных и областных уровнях. При необходимости выполнения вышеперечисленных исследований для пациентов из регионов республики, где отсутствует возможность их проведения, больные направляются на консультацию в УЗ «9-я ГКБ» г. Минска, которая не является головным учреждением службы. Необходимо отметить, что в

настоящее время отмечается тенденция к приобретению оборудования для проведения высокотехнологичных (иммунофенотипических, цитогенетических, молекулярно-биологических) исследований учреждениями здравоохранения областного уровня. В связи с высокой стоимостью как самого оборудования, так и расходных материалов, необходимостью подготовки высококвалифицированных специалистов, его рациональное использование возможно при полной нагрузке оборудования, что определяется ежедневным количеством необходимых исследований.

Общее количество врачей-гематологов (физических лиц), осуществляющих стационарное лечение и ведущих диспансерный прием больных по республике в целом составляет 53 человека. Для оказания стационарной помощи больным с заболеваниями крови в РБ выделено 46,5 врачебных ставок, из которых занято 45,5 (98 %). Количество физических лиц (врачей-гематологов) составляет 39 человек. Из 8,25 ставок врачей гематологов по пересадке костного мозга занято 8,0 (97 %). Диспансерное наблюдение гематологических больных в республике осуществляется в 22 гематологических кабинетах. В 2010 г. обучение в клинической ординатуре проходили 3 врача-гематолога, в заочной аспирантуре — 3 врача-гематолога.

Консультативную помощь гематологическим больным оказывают также 4 сотрудника клинического отдела ГУ «РНПЦ ГиТ» и 3 сотрудника кафедры гематологии и трансфузиологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО).

Всего в 2010 г. в гематологических стационарах республики пролечено 15007 пациентов, в 2009 г. — 14341 пациент.

В 2010 г. в УЗ «9-я ГКБ» г. Минска открыты и функционируют лаборатории клеточных биотехнологий, HLA-типирования, позволяющие проводить подбор пар донор-реципиент для трансплантации гемопоэтических клеток. Начато формирование городского Регистра типированных доноров костного мозга, включающего к настоящему времени 3350 добровольцев. В течение 2010 г. в отделении трансплантации костного мозга проведено 122 процедуры трансплантации (в 2009 г. — 78; в 2008 г. — 69; в 2007 г. — 44 трансплантации) костного мозга и стволовых клеток периферической крови. Лечение больных проводится строго по стандартизованным протоколам, рекомендуемым Европейской Ассоциацией Центров Трансплантации Костного мозга (EBMT).

Всего на диспансерном учете на 01.01.2011 г. в Республике Беларусь состояло 10035 человек: из них 3727 человек (37,1 %) — трудоспособного возраста.

По данным электронного Регистра коагулопатий, в республике на учете состоит 764 пациента. Оказание медицинской помощи больным с гемостазиопатиями осуществляется силами и средствами гематологической службы в круглосуточных (во всех регионах) и дневных стационарах.

Консультативная помощь гематологическим больным на республиканском и областном уровнях оказывается своевременно и в полном объеме, жалоб со стороны больных на несвоевременное или некачественное оказание консультативной помощи в 2010 г. не регистрировалось. В случае необходимости экстренная медицинская помощь оказывается специалистами клинического отдела ГУ «РНПЦ ГиТ», врачами гематологического отделения ГУ «РНПЦ РМи-ЭЧ», сотрудниками кафедры гематологии и трансфузиологии БелМАПО, врачами-гематологами УЗ «9-я ГКБ г. Минска» и врачами-гематологами областных больниц. В 2010 г. врачами-гематологами республики проведено 94455 консультаций, осуществлено 29 плановых выездов и 499 экстренных выездов. Между различными структурами гематологической службы осуществляется преемственность в ведении больных с заболеваниями крови.

В целях дальнейшего развития и совершенствования оказания гематологической помощи населению Республики Беларусь сотрудниками кафедры БелМАПО проводятся обучающие семинары в регионах. В 2010 г. были проведены семинары: «Современные технологии диагностики и лечения болезней крови в клиническую практику» и «Проблемы гемостаза в клинической практике».

Таким образом, с целью повышения качества и доступности медицинской помощи пациентам с патологией системы кроветворения, внедрения современных технологий лечения, необходимо решение следующих вопросов:

1. Для повышения эффективности работы гематологической службы целесообразна оптимизация структуры гематологических коек в регионах республики с учетом заболеваемости населения, в т. ч. коек дневного пребывания.

2. Для обеспечения разработки и внедрения современных технологий лечения гематологических больных, осуществления методического руководства службы необходима организация на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска РНПЦ гематологии и клеточных технологий.

3. Для удовлетворения потребности практического здравоохранения в высокотехнологичных методах трансплантации костного мозга и стволовых клеток, развития гематологической службы необходимо строительство

гематологического модуля в составе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска.

4. Для рационального и эффективного использования лабораторного оборудования при лечении больных из всех регионов целесообразна централизация высокотехнологичных лабораторных исследований в УЗ «9-я ГКБ» и ГУ «РНПЦ РМиЭЧ».

УДК 616.155.392.8

ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ОСТРОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ

Е. А. Федоровская, Е. А. Мельник, Н. К. Скачкова,
А. П. Рыбальская, Л. Н. Немировская

Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины, г. Киев

Определены возбудители инфекционно-воспалительных осложнений у 42 больных острой миелоидной лейкемией. Исследована их чувствительность к антибиотикам и антимикотикам, в соответствии с которой проведено этиотропное антиинфекционное лечение. Индивидуально подобранная антибиотикотерапия позволила своевременно купировать очаги воспаления, что не препятствовало последующему лечению пациентов.

Ключевые слова: больные острой миелоидной лейкемией, инфекционно-воспалительные осложнения, химиотерапевтические препараты.

CAUSATIVE AGENTS OF INFECTIVE INFLAMMATORY COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

E. A. Fedorovskaya, E. A. Melnik, N. K. Skachkova,
A. P. Rybalskaya, L. N. Nemirovskaya

Institute of Haematology and Transfusiology AMS Ukraine, Kiev

The causative agents of infective inflammatory complications in 42 patients with acute myeloid leukemia have been detected. Their sensitivity to antibiotics and antimicrotics was studied, and according to which the etiotropic infectious treatment was carried out. The individually selected antibiotic therapy made it possible to arrest in proper time the inflammation foci, which did not impede the subsequent treatment of the patients.

Key words: patients with acute myeloid leukemia, infective inflammatory complications, chemical therapeutic preparations.

Известно, что на фоне цитостатической миелосупрессии и выраженного иммунодепрессивного состояния, у 80–85 % больных острой лейкемией (ОЛ) развиваются тяжелые инфекционно-воспалительные осложнения (ИВО) [3]. В достижении положительных результатов лечения больных ОЛ важную роль играет адекватная сопроводительная терапия, в т. ч., и целенаправленное использование химиотерапевтических препаратов.

Цель исследования

Выявление возбудителей ИВО с исследованием их антибиотико- и антимикотикограмм у больных острой миелоидной лейкемией (ОМЛ).

Материалы и методы исследования

Были обследованы 42 больных ОМЛ (I–IV стадии) с ИВО, которые находились на лечении в отделении заболеваний системы крови ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины». Клинические исследования прово-

дили для улучшения обеспечения противоопухолевыми препаратами учреждений здравоохранения гематологической службы необходимо создание резерва Минздрава на складе БелРУП Фармации в объеме 10 % от всего объема централизованной закупки лекарственных средств.

дила врач-гематолог, к. м. н. Н. В. Горяинова — под руководством проф. Н. Н. Третяк.

Микробиологические исследования включали обследование крови (по показаниям), слизистых оболочек носовой полости и зева. Идентификацию выделенных штаммов проводили в соответствии с критериями определителей Берджи [1], и Kurtzman и соавт. [4] на основе изучения их физиолого-биохимических характеристик и выявленных патогенных свойств. Чувствительность возбудителей к 52 антибиотическим и 6 антимикотическим препаратам определяли диско-диффузионным методом [2].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований из биопатов больных ОМЛ было изолировано 56 штаммов микроорганизмов — возбудителей ИВО, которые выделялись в диагностически значимых титрах от 10² до 10⁶ колониеобразующих единиц в

1 мл (КОЕ/мл) (таблица 1). Лидирующее место занимали микроорганизмы *p. Staphylococcus* (25 % случаев) и представители кишечной микрофлоры *p. Enterococcus* (17,85 %) — возбудители пневмонии, плеврита, бронхита, ангины, стоматита, отита. Значительную негативную роль выполняли изолированные в 21,42 % случаев дрожжеподобные грибы *p. Candida*, которые инициировали бронхопневмонию, отит, мукозит. Наиболее тяжелое течение пневмонии, приведшее к развитию синегнойного сепсиса с фатальными последствиями, было вызвано *Pseudomonas aeruginosa*. Среди других этиологических агентов пневмонии, бронхита, ангины, отита выявлены фирмакутные микроорганизмы: *pp. Corynebacterium* (7,14 %), *Streptococcus* (3,58 %), а также грациликотные: *Moraxella catarrhalis* (5,35 %), *Klebsiella sp.* (3,57 %), *Enterobacter sp.* и *Proteus mirabilis* (по 1,79 %).

По результатам исследований диагностировано 47 эпизодов ИВО, инициированные возбудителями как в монокультуре, так и в ассоциациях. Наиболее активными ассоциантами-возбудителями ИВО у больных ОМЛ выявлены микроорганизмы *pp. Enterococcus* (6 случаев), *Corynebacterium sp.* (4), *Staphylococcus sp.* и *Candida albicans* (по 3 случая).

С целью назначения больным рациональной антиинфекционной терапии определяли индивидуальную чувствительность изолированных штаммов к антибактериальным и антимикотическим препаратам (таблица 2). Представители *p. Staphylococcus* были наиболее чувствительными к отдельным антибиотикам групп макролидов, цефалоспоринов.

Таблица 1 — Возбудители инфекционно-воспалительных осложнений, изолированные из биотопов больных острой миелоидной лейкемией

Микроорганизмы, роды, виды	Количество		Титр, КОЕ/мл	Изоляты, абс		Инфекционно-воспалительные осложнения
	п	%		моно-культуры	ассоцианты	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3,57	104	2	0	Остеомиелит, абсцесс плеча
<i>S. epidermidis</i>	7	12,50	103–105	6	1	Пневмония, хронический бронхит, ангина, стоматит
<i>S. saprophyticus</i>	1	1,79	105	1	0	Сепсис
<i>Staphylococcus sp.</i>	4	7,14	105	1	3	Плеврит, пневмония, отит, лихорадка
<i>Streptococcus agalactia</i>	1	1,79	106	0	1	Лихорадка
<i>S. pneumoniae</i>	1	1,79	104	0	1	Ангина, отит
<i>Enterococcus sp.</i>	10	17,85	102–106	4	6	Плеврит, пневмония, бронхит, язвенно-некротический стоматит, ангина, отит
<i>Corynebacterium sp.</i>	4	7,14	104–106	0	4	Пневмония, плеврит, бронхит, ангина, отит
<i>Moraxella catarrhalis</i>	3	5,35	103	2	1	Пневмония, бронхит, ангина
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,79	102	0	1	Пневмония
<i>Enterobacter sp.</i>	1	1,79	103	0	1	Пневмония
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	10,71	102–105	4	2	Пневмония, сепсис, язвенно-некротический стоматит, гнойный лимфаденит, лихорадка
<i>Klebsiella sp.</i>	2	3,57	103–105	2	0	Пневмония, гнойная ангина
<i>Candida albicans</i>	6	10,71	102–105	3	3	Пневмония, лихорадка, стоматит, мукозит
<i>Candida sp.</i>	3	5,35	102–105	2	1	Бронхопневмония, лихорадка, мукозит
<i>C. rugosa</i>	2	3,57	102–104	0	2	Мукозит
<i>C. glabrata</i>	1	1,79	102	0	1	Отит
<i>Criptococcus sp.</i>	1	1,79	103–104	0	1	Язвенно-некротический стоматит
Всего	56	100,0	102–106	27	29	—

Таблица 2 — Чувствительность к химиотерапевтическим препаратам возбудителей, изолированных из биотопов больных острой миелоидной лейкемией

Микроорганизмы, роды	Чувствительные штаммы микроорганизмов, %							
	антибиотические препараты, группы							
	пенициллины	аминогликозиды	тетрациклины	макролиды	цефалоспорины	фторхинолоны	линкозамиды	отдельные
<i>Staphylococcus</i>	28,6	26,5	20–2,9	30–85,7	30–71,4	20–42,9	28,5–40	42,9–85,7
<i>Enterococcus</i>	0–50	10,0–22,2	33,3–4,5	25–57,1	20–50	20–50	10–30	10–40
<i>Pseudomonas, Enterobacter, Klebsiella, Proteus</i>	10	30–40	10	10–20	20–30	30–70	0	10–30
	антимикотические препараты							

	ниста- тин	амфоте- рицин В	клотри- мазол	итрако- назол	флуконазол	кетокконазол
<i>Candida sp.</i>	65,8	53,7	68,7	6,7	6,7	23,3

Тетрациклины, фторхинолоны и линкомицин ингибировали от 20 до 42,9 % культур стафилококков.

По результатам антибиотикограмм микроорганизмы *p. Enterococcus* в 20–57,1 % случаев были чувствительны к тетрацикламам, макролидам, цефалоспорином, фторхинолонам, аминогликозидам (стрептомицин), пеницилинам (пиперациллин, карбенициллин, азлоциллин), линкосаидам (клиндамицин), левометицину, ванкомицину, рифампицину.

Грациликотные возбудители ИВО у больных ОМЛ в основном были устойчивы к антибиотическим препаратам. Следует отметить, что некоторые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella sp.* проявили чувствительность к азлоциллину, доксициклину, эритромицину и рифампицину, цинобаку, цефепиму, рокситромицину.

Результаты исследования чувствительности дрожжеподобных грибов к антимикотикам показали, что наиболее активно влияли клотримазол, нистатин и амфотерицин В. В то же время, к итраконазолу и флуконазолу чувствительными были не более 6,7 % выделенных штаммов.

Заключение

Больным острым лейкозом, как правило, эмпирически назначают антибактериальные и антимикотические препараты. Однако такая терапия часто оказывается не эффективной, требует периодической смены препаратов различных

классификационных групп, что приводит к нецелесообразному лечению, повышению его стоимости, оказывает дополнительное токсическое действие на ослабленный организм, провоцирует появление резистентных штаммов микроорганизмов, что в целом усугубляет состояние больных с ИВО и удлиняет сроки лечения. Кроме того, наличие ИВО приводит к необходимости отмены протокольной цитостатической терапии, что фактически способствует накоплению массы опухолевого клона и, как следствие, прогрессированию основного заболевания.

По результатам наших исследований было установлено, что проведение адекватной этиотропной терапии, основанной на результатах микробиологических исследований с учетом индивидуальной чувствительности изолированных возбудителей, способствует купированию инфекционного процесса, улучшению общего состояния больных и позволяет сократить сроки их лечения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта [и др.]; пер. с англ. Г. А. Заварзина. — М.: Мир, 1997. — 800 с.
2. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»: Наказ МОЗ України від 05. 04. 2007 № 167. — Київ., 2007. — 113 с.
3. Третьяк, Н. М. Гематология: навчальний посібник / Н. М. Третьяк. — Київ: Зовнішня торгівля, 2005. — 240 с.
4. Kurtzman, C. P. The yeasts. A taxonomic study / C. P. Kurtzman, J. W. Fell. — Elsevier, Amsterdam, 1998. — 1055 p.

УДК 616.155.194:575

АНЕМИЯ ФАНКОНИ У ДЕТЕЙ: КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И СПЕКТР ВАРИАЦИЙ В ГЕНЕ FANCA

С. О. Шарапова, А. С. Романцова, А. В. Тарасова, Т. А. Углова,
А. С. Пилипчик, М. В. Белевцев, Н. Н. Савва

Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, г. Минск

В период с 1992 по 2010 гг. в РБ верифицированный диагноз анемии Фанкони (АФ) был выставлен 19 детям в возрасте от 1 года 3 мес. до 16 лет, из них 11 (57,9 %) мальчиков и 8 (42,1 %) девочек. Наиболее частыми аномалиями развития у детей с АФ явились: патологическая пигментация кожи, аномалии костей и глаз. Для проведения мутационного анализа гена FANCA была получена ДНК из мононуклеаров периферической крови и костного мозга 9 пациентов. Фрагментный анализ гена FANCA выявил нарушения в ДНК 2-х пациентов (делеция 1–6 экзона и делеция 6 экзона). Мутационный скрининг 43 экзонов гена FANCA определил мутации еще у троих пациентов (экзон 19, экзон 27, экзон 28). Из 5 обнаруженных мутаций 2 были новые. Мутационный скрининг в этой группе выявил также многочисленные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), у 5 пациентов в сочетании с мутациями в гене FANCA, у 3-х пациентов были обнаружены только SNP, и у одного не было обнаружено ни мутаций, ни SNP.

Ключевые слова: дети, анемия Фанкони, мутация, полиморфизм.

FANCONI'S ANEMIA IN CHILDREN: CLINICAL DESCRIPTION AND VARIATION SPECTRUM IN FANCA GENE

S. O. Sharapova, A. S. Romantsova, A. V. Tarasova, T. A. Uglova,
A. S. Pilipchik, M. V. Belevtsev, N. N. Savva

Republican Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

Nineteen children, of them 11 boys (57,9%) and 8 girls (42,1%) aged from 1,3 to 16 were diagnosed with verified Fanconi's anemia in the Republic of Belarus in the period from 1992 to 2010. Pathologic skin pigmentation, bone and eye anomalies were the most widespread anomalies in the children's development. To perform the mutagenic analysis of FANCA gene, DNA from the peripheral blood and marrow mononuclears of 9 patients was extracted. The fragmentary analysis of FANCA gene revealed DNA abnormalities in 2 patients (1–6 exone deletion and 6 exone deletion). The mutation screening of 43 exons of FANCA gene detected mutation in three more patients (exone 19, exone 27, exone 28). Two mutations of 5 detected ones were new. The mutation screening in this group in the combination with FANCA gene mutations in five patients revealed also numerous one-nucleotide polymorphism (SNP), 3 patients revealed only SNP, and one patient had neither mutations nor SNP.

Key words: children, Fanconi's anemia, mutation, multimorphism.

Введение

АФ — редкое врожденное заболевание, характеризующееся нестабильностью геномного аппарата, врожденными аномалиями развития, нарушением гемопоэза и высоким риском развития острого лейкоза и различных солидных опухолей. Врожденные аномалии включают морфометрические нарушения лица и головы, скелетные аномалии, а именно пороки лучевых костей и большого пальца, нарушение роста и развития, патологическую пигментацию кожи, снижение слуха, патологию почек, сердца, полового тракта, глаз. Врожденные аномалии у АФ-пациентов могут быть представлены в диапазоне от полного отсутствия (у 25 % пациентов) до мультиорганный поражения организма. Кардинальная клиническая особенность — это тяжелая прогрессирующая панцитопения, а также склонность к онкотрансформации. [1, 3]. Диагноз АФ основан на повышенной чувствительности хромосом пациента к ДНК-повреждающим агентам — дизпоксибутану (ДЭБ) и митомцину С (ММС) [5]. Генетической основой АФ являются мутации в 15 генах FANCA, которые формируют 15 комплементарных групп (A, B, C, D1 [BRCA2], D2, E, F, G, I, J [BRIP1], L, M, N [PALB2], O [RAD51C], P [SLX4]). Продукты этих генов формируют общую сеть убиквитин-фосфорилирования, т. н. «сигнальный путь АФ» и, кооперируясь с другими белками, вовлекаются в репарацию ДНК, контроль клеточного цикла, в восстановление двухцепочечных разрывов и поддержание стабильности генома [2, 6]. Аномальные гены при АФ наследуются аутосомно-рецессивно и только FANCB наследуется Х-сцепленно. Около 85 % всех пациентов АФ имеют дефект в 1 из 3-х генов FANCA, FANCC, FANCG [1]. Мутации в гене для комплементарной группы FA-A (FANCA, MIM# 607139) встречаются в 65 % всех описанных случаев АФ [4]. Спектр их очень вариабельный. По последним данным Международного регистра АФ (Rockefeller University, New York, USA) 757 пациен-

тов имели комплементарную группу FA-A с выявлением 451 уникальной мутации.

Цель исследования

Изучение клинических особенностей и характера изменений в гене FANCA в группе пациентов с АФ в Беларуси.

Материалы и методы исследования

В исследование включено 19 детей, возраст постановки диагноза от 1 года 3 мес. до 16 лет, находившихся на лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и гематологии» (РНПЦДОГ) и детское гематологическое отделение УЗ «1-я Городская клиническая больница» (ГКБ) г. Минска с 1992–2010 гг. Анализ клинических данных проводился в соответствии с регистрационной картой Международного центра по изучению АФ (IFAR, New-York, USA).

Для проведения мутационного анализа гена FANCA были подобраны праймеры к 43 экзонам и к интронным последовательностям, фланкирующим границы экзонов, с учетом известных однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций гена FANCA. Для этого использовали программу Primer3Plus и Primer-BLAST. Генетический анализ гена FANCA включал: 1) выделение ДНК из мононуклеаров периферической крови и образцов костного мозга пациентов с верифицированным диагнозом АФ; 2) фрагментный анализ гена FANCA с использованием коммерческого набора SALSA MLPA Kit P031/P032-2 FANCA (MRC-Holland BV) по инструкции производителя на секвенаторе ABI 3130 (USA); 3) SSCP для 43 экзонов гена FANCA; 4) секвенирование экзонов с нарушенной подвижностью фрагментов по SSCP.

Результаты исследования и их обсуждение

Из 19 пациентов АФ диагностирована у 11 (57,9 %) мальчиков и 8 (42,1 %) девочек. Средний возраст постановки диагноза составлял $8,2 \pm 3,4$ года. На сегодняшний день живы 8 человек: 4 после трансплантации гемопоэтической ство-

ловой клетки (ТГСК), 4 — без ТГСК. 1 потерян из наблюдения. Умерли 10 пациентов. Из 19 пациентов 15 родились и проживали на территории Беларуси, четверо, диагностированные в РБ, были резидентами других стран (Украина — 2, Казахстан — 1, Азербайджан — 1).

У больных АФ отмечался широкий спектр врожденных пороков (таблица 1).

Средний возраст гематологической манифестации АФ составил $5,5 \pm 2,8$ лет. У 15 из 19 пациентов (78,9 %) первым гематологиче-

Таблица 1 — Врожденные пороки развития у больных анемией Фанкони

Пороки пациентов в Беларуси		n	%
Кожа	Гипо-/гиперпигментация, пятна «кофе с молоком», врожденный ихтиоз	13	68,4
Глаза	Микрофтальмия, сужение глазной щели, гипо-/гипертелоризм, миндалевидный разрез глаз	11	57,9
Большой палец и лучевая кость	Гипоплазия, отсутствие, аномалия развития большого пальца, отсутствие пястных, трапециевидных, ладьевидных костей	5	26,3
Другие кости	Синдактилия пальцев ноги, готическое небо, асимметрия черепа, вывих обеих бедренных костей, брахидактилия, высокое стояние левой лопатки, полидактилия	11	57,9
Почки и мочевыводящие пути	Эктопическое расположение, удвоение почки, нефроптоз, гипо-/диспластическая или отсутствующая почка	7	36,8
Половая система	Мальчики: неопущение яичек, крипторхизм	4	36,4
	Девочки: гипоплазия яичников, аменорея	1	12,5
Сердечно-сосудистая система	Пролапс митрального клапана, ОАП, ДМЖП, гипертрофия желудочков	7	36,8
Центральная нервная система	Микроцефалия, олигофрения, умственная отсталость, гиперрефлексия	6	31,6

В генетический анализ гена FANCA были включены образцы ДНК 9 пациентов, диагностированных и получавших лечение в ГУ «РНПЦДОГ» (6 мальчиков, 1 девочка из Беларуси, 1 мальчик — Украина, 1 девочка — Казахстан). Первым этапом генетического анализа ДНК пациентов был фрагментный анализ, направленный на детекцию крупных делеций генетического материала четных и не четных экзонов. Этот метод был выбран первым этапом в генетической диагностике с учетом превалирования больших внутригенных делеций [6]. У 2 пациентов из 9 (22 %) в образцах ДНК выявлен положительный результат: у 1-го пациента — делеция 1–6-го экзона, у другого — 6-го экзона. Следующим этапом являлось секвенирование

ским проявлением была тромбоцитопения, у 4 (21%) — снижение уровня гемоглобина. В дальнейшем болезнь прогрессировала в панцитопению. У 7 из 19 (36,8 %) больных отмечался повышенный уровень фетального гемоглобина от 5 до 60 %. У 4 (21 %) больных произошла трансформация заболевания в миелодиспластический синдром (МДС) и острый лейкоз (2 — МДС и 1 ОМЛ, 1 бифенотипический лейкоз — маркеры миело + Т).

фрагментов с нарушенной подвижностью по SSCP. Мутации были обнаружены еще у 3-х пациентов. Из 5 обнаруженных мутаций 2 были новые (таблица 2). Все пациенты с мутациями в гене FANCA были мальчиками.

У всех 5 пациентов с обнаруженной мутацией в гене FANCA были детектированы однонуклеотидные полиморфизмы (SNP — single nucleotide polymorphism), у 3-х пациентов были обнаружены только SNP, у одного не было обнаружено ни мутаций, ни SNP. Среди 10 описанных наиболее часто встречающихся SNP в гене FANCA [Levan et al. 2005] в нашей группе пациентов встречались 5 (T > C, G > A, G > A, C > T, T > C), причем как в гомозиготном, так и гетерозиготном состоянии.

Таблица — 2 Результаты мутационного анализа больных АФ

Пациент, номер	ДЭБ-тест	Выявленная мутация	Изменение аминокислотной последовательности	Экзон / интрон	Количество аллелей выявления	Ссылка
1	Спонт 14, ДЭБ 36	C > G	p. Ser858Arg	экзон 27	1	Wijker et al, 1999
2	Спонт 41(20), ДЭБ 28	C	Frame shift (мутация со сдвигом рамки считывания)	экзон 19	1	Новая

3	Спонт 14, ДЭБ 86		—	экзон 1–6	2	Levran et al, 2005
4	Спонт 16, ДЭБ 40		—	экзон 6	2	Fanconi anemia database
5	Спонт 16, ДЭБ 32	G > T	p. Arg880Leu	экзон 28	1	новая

Выводы

Наиболее частыми аномалиями развития у детей с АФ в РБ являются патологическая пигментация кожи, аномалии костей и глаз.

Мутационный спектр гена FANCA очень вариабельный. Большие делеции в этом гене не характерны для нашей выборки пациентов. ДНК пациентов с невыявленными мутациями в FANCA, будут в дальнейшем исследованы на мутации в гене FANCC и FANCG для определения субтипов анемии Фанкони в Беларуси.

Работа выполнена в рамках проекта ОНТП «Здоровье женщины и ребенка — благополучие семьи и государства», задание «Разработать и внедрить методологию комбинированной гене-

тической и иммунологической диагностики врожденных X-сцепленных дефектов иммунной системы и анемии Фанкони», сроки выполнения 2010–2012 гг.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Auerbach, A. D. Fanconi Anemia and its Diagnosis / A. D. Auerbach // *Mutat Res.* — 2009. — Vol. 668(1–2).
2. Kitao, H. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response / H. Kitao, M. Takata // *Int. J. Hematol.* — 2011. — Vol. 93(4). — P. 417–424.
3. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR) / D. I. Kutler [et al.] // *Blood.* — 2003. — Vol. 101. — P. 1249–1256.
4. Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study / O. Levran [et al.] // *Hum Mut.* — 2005. — Vol. 25(2). — P. 142–149.
5. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia / H. Seyeschab [et al.] // *Blood.* — 1995. — Vol. 85. — P. 2233–2237.
6. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress / T. Taniguchi, A. D. D'Andrea // *Blood.* — 2006. — Vol. 107(1).

УДК 616.155.2-097

ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ВИСКОТТ-ОЛДРИЧ

С. О. Шарапова, А. А. Мигас, Т. А. Углова, Л. Н. Бышнёва, М. В. Белевцев

Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, г. Минск

В ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии» (РНПЦДОГ) точный диагноз синдром Вискотт-Олдрич был выставлен 6 мальчиком в возрасте от 4 мес. до 15 лет. У всех пациентов выявлены мутации гена WAS. В спектре обнаруженных мутаций преобладали миссенс мутации во 2 и 3-м экзоне, обнаруженные у 4-х пациентов. У этих пациентов отмечалось полное отсутствие WASP в лимфоцитах и достаточно тяжелое течение заболевания. Лишь у одного ребенка с мутацией во 2-м экзоне гена WAS наблюдалось мягкое течение заболевания. У 2 пациентов мутации локализованы в 10 экзоне, это нонсенс мутации. У одного пациента с такой мутацией экспрессия WASP была частично сохранена.

Ключевые слова: синдром Вискотт-Олдрич, мутация, генотип.

GENOTYPE-PHENOTYPIC DESCRIPTION OF PATIENTS WITH WISKOTT-ALDRICH SYNDROME

S. O. Sharapova, A. A. Migas, T. A. Uglova, L. N. Byshniova, M. V. Belevtsev

Republican Research Centre for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

Six boys aged from 4 months to 15 years old were diagnosed with Wiskott-Aldrich syndrome in the Republican Research Centre for Pediatric Oncology and Hematology. All the patients revealed WAS gene mutations. The missense-mutations in exons 2 and 3, detected in 4 patients prevailed in the spectrum of the mutations. WASP was fully absent in lymphocytes and rather a severe course of the disease was observed in all the patients. Only one child with WAS gene mutation in second exon had a mild course of the disease. The mutations were localized in tenth exon in two patients, which is a nonsense of the mutation. The WASP expression was partially preserved in one patient with such mutation.

Key words: Wiskott-Aldrich syndrome, mutation, genotype.

Синдром Вискотта-Олдрича (Wiskott-Aldrich syndrome, WAS) (OMIM 301000) — редкий X-сцепленный рецессивный первичный иммунодефицит, вызванный мутацией гена WAS с триадой диагностических клинических элементов: иммунодефицит, экзема, тромбоцитопения с тромбоцитами малого размера. Проявлением иммунодефицита у больных являются тяжелые инфекции, аутоиммунные заболевания (васкулит, аутоиммунная гемолитическая анемия, гломерулонефрит и др.) и склонность к развитию злокачественных новообразований (лейкозов, лимфом, опухолей мозга) [1]. Тяжесть проявлений заболевания у больных с WAS варьирует от рецидивирующей тромбоцитопении с минимальными геморрагическими проявлениями до тяжелого заболевания с выраженным инфекционным и аутоиммунным синдромами [2]. У многих пациентов повышен уровень иммуноглобулина Ig E и IgA, снижен уровень IgM. Частота встречаемости WAS: 1–10 случаев на 1 млн новорожденных мальчиков [3].

На сегодняшний день установлено свыше 300 мутаций в WAS гене, включающих весь возможный спектр: мутации со сдвигом рамки считывания, миссенс- или нонсенс-мутации, мутации в сплайсайтах, делеции, инсерции и др., которые приводят к абберантной транскрипции. Мутации выявляются на всех 12 экзонах WAS гена, однако их распределение является неравномерным, большинство из них встречается в первых четырех экзонах N-терминального конца. В настоящее время установлено, что миссенс-мутации, происходящие в первых трех экзонах, приводят к умеренному фенотипу заболевания и часто характеризуются сниженным уровнем экспрессии WASP. Более сложные мутации в этих экзонах, включая инсерции, делеции, сплайсинг мутации, характеризуются более тяжелым фенотипом с отсутствием, нестабильным или чрезвычайно низким уровнем экспрессии WASP. Доказано, что мутации, которые происходят на C-конце WASP гена, характеризуются отсутствием экспрессии белка [4].

Цель исследования

Выявление клинико-лабораторных особенностей фенотипа синдрома Вискотт-Олдрича у детей в Республике Беларусь в зависимости от типа и локализации мутации в гене WAS.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 6 мальчиков с диагнозом синдром Вискотт-Олдрича, находящихся на лечении в ГУ «РНПЦДОГ». Основными диагностическими критериями являлись: тромбоцитопения, малый размер тромбоцитов, нарушение экспрессии WASP, выявление мутаций в гене WAS. Дополни-

тельные диагностические критерии: наличие экземы, текущая бактериальная или вирусная инфекция или условно-патогенная инфекция в раннем возрасте, семейный анамнез с указанием на наличие тромбоцитопении у лиц мужского пола по материнской линии, аутоиммунных заболеваний или лимфом в раннем возрасте. Определение размера тромбоцитов проводили методом морфометрии с использованием иммерсионной световой микроскопии. Определение экспрессии белка WAS в лимфоцитах периферической крови осуществлялось методом проточной цитометрии на аппарате «FACScan» фирмы «Becton Dickinson», США с использованием реагентов этой же фирмы). Проведение мутационного анализа гена WAS методом прямого секвенирования на приборе «GeneticAnalyzer ABI 3130» (Hitachi, Япония).

Клинический фенотип каждого пациента оценивали по балльной системе: 1 — наличие только тромбоцитопении с тромбоцитами маленького размера; 2 — наличие тромбоцитопении с тромбоцитами малого размера в сочетании с умеренно выраженной преходящей экземой; 3 — наличие тромбоцитопении с тромбоцитами малого размера в сочетании со стойкой экземой и инфекциями; 4 — наличие тромбоцитопении с тромбоцитами малого размера в сочетании с тяжелой экземой и тяжелыми инфекциями; изменение балла на 5 при развитии аутоиммунного или злокачественного заболевания.

Результаты исследования и их обсуждение

Первые проявления заболевания возникали в возрасте до 6 мес. (Me 2,75 мес.) в виде геморрагического синдрома и тромбоцитопении с уровнем тромбоцитов от единичных до $28 \times 10^9/\text{л}$ (Me $12 \times 10^9/\text{л}$). Экзема разной степени интенсивности выявлена у 4-х пациентов. У 2-х детей в анамнезе по материнской линии у лиц мужского пола — тромбоцитопения. Двум проведена спленэктомия, осложнившаяся инвагинацией и сепсисом. Оба пациента живы и не имеют проявлений тромбоцитопении после спленэктомии. У 1-го из них развилось аутоиммунное заболевание. Частые простудные заболевания, рецидивирующие отиты или гаймориты отмечались у 3-х детей. Стандартное иммунологическое исследование периферической крови не выявило нарушений в субпопуляционном составе лимфоцитов и уровне иммуноглобулинов ни у одного пациента.

У всех пациентов в гемограмме преобладали тромбоциты размером до 2 мкм (малые фор-

мы): от 63 до 83,5 % (Ме 63,5 %), при норме до 26 % (рисунок 1).

Клинический фенотип только у одного пациента оценен в 1 балл, у 4-х — в 2 балла, у 1 — 5 баллов (таблица 1).

У 3-х пациентов определена экспрессия WASP в лимфоцитах, у 2-х из них экспрессия полностью отсутствовала.

У всех пациентов выявлены мутации гена WAS. В спектре обнаруженных мутаций преобладали миссенс мутации во 2 и 3-м экзоне, обнаруженные у 4-х пациентов (2 экзон: 612 G > A,

86 Arg > His, 612 G > A 86 Arg- > His, 5583 G > C 77 Asp->His, 3 экзон: 1792 T > C 105 Leu > Pro). У этих пациентов отмечалось полное отсутствие WASP в лимфоцитах и достаточно тяжелое течение заболевания. Лишь у одного ребенка с мутацией во 2-м экзоне гена WAS наблюдалось мягкое течение заболевания (1 балл). У 2 пациентов мутации локализованы в 10 экзоне, это nonsense мутации (10 экзон: 4897G > T; 322Gly-> stop, 4894 G > T 321 Arg -> stop). У 1-го пациента с такой мутацией экспрессия WASP была частично сохранена (таблица 1).

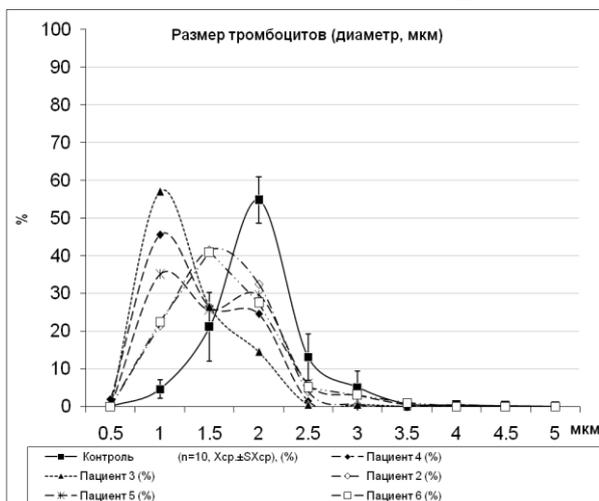


Рисунок 1 — Размер тромбоцитов у пациентов с WAS

Таблица 1 — Генотип/фенотипическая характеристика пациентов с WAS

Пациент	Клиническая оценка (балл)	Возраст на момент исследования	Мутация в гене WAS, экзон, тип мутации	Экспрессия белка WASP в лимфоцитах
1	5	18 лет	Экзон 2: 612 G > A, 86 Arg > His	полностью отсутствует
2	2	10 лет	Экзон 3: 1792 T > C, 105 Leu > Pro	полностью отсутствует
3	2	3 года 7 мес.	Экзон 2: 583 G > C, 77 Asp > His	н. д.
4	2	1 год	Экзон 10: 4897 G > T, 322Gly > stop	частично сохранена
5	1	5 мес.	Экзон 2: 612 G > A, 86 Arg > His	н. д.
6	2	3 мес.	Экзон 10: 4894 G > T, 321Arg > stop	н. д.

Заключение

Таким образом, миссенс мутации в первых трех экзонах гена WAS детей Республики Беларусь сопровождаются достаточно тяжелым течением заболевания и нарушением экспрессии WAS протеина (полным отсутствием). Экспрессия в 10-м экзоне сопровождается более мягким фенотипом и частичной экспрессией WAS протеина.

Работа выполнена в рамках проекта ОНТП «Здоровье женщины и ребенка — благополучие семьи и государства», задание «Разработать и внедрить методологию комбинированной генетической и иммунологической диагностики врожден-

ных X-сцепленных дефектов иммунной системы и анемии Фанкони», сроки выполнения 2010–2012.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Thrasher, A. J. New insights into the biology of Wiskott-Aldrich syndrome / A. J. Thrasher // Hematology. — 2009.
2. Notarangelo, L. D. Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopeni / L. D. Notarangelo // Blood. — 2002. — Vol. 99(6). — P. 2268–2289.
3. WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype / K. Imai [et al.] // Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. — 2003. — Vol. (3). — P. 427–436.
4. Ochs, H. D. Mutations of the Wiskott–Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes / H. D. Ochs // Immunol Res. — 2009. — Vol. (44). — P. 84–88.

УДК 616-005.1-08

НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ**В. М. Шмелева, Н. Б. Салтыкова, Л. П. Папаян****Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, г. Москва**

Обследовано 339 пациентов с сердечно-сосудистой патологией и 260 лиц контрольной группы. Измерение уровня гомоцистеина в плазме проводилось методом жидкостной хроматографии под высоким давлением с флуоресцентной детекцией. Проведено сравнение показателей плазменного и тромбоцитарного гемостаза у больных с нормальным и повышенным уровнем гомоцистеина плазмы. Согласно полученным данным, повышение уровня гомоцистеина играет значимую роль в формировании гиперкоагуляционного синдрома. Наличие гипергомоцистеинемии приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, активации коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза, снижению активности естественных антикоагулянтов и фибринолиза.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, гемостаз, гиперкоагуляция.

HEMOSTASIS ABNORMALITIES IN HYPERHOMOCYSTEINEMIA**V. M. Shmeliova, N. B. Saltykova, L. P. Papayan****Russian Research Institute for Hematology and Transfusiology, Moscow**

339 patients with cardiovascular pathology and 260 persons of the control group have been examined. The level of homocystein in plasma was measured by means of liquid chromatography under high pressure with fluorescent detection. The indicators of plasmic and thrombocyte hemostasis in the patients with normal or heightened level of plasma homocystein were compared. According to the obtained data, the increase of the homocystein level plays an important role in the formation of hypercoagulation syndrome. The presence of hyperhomocysteinemia leads to the development of endothelial dysfunction, activation of coagulation and thrombocyte parts of hemostasis, decrease of natural anticoagulants and fibrinolysis activity.

Key words: hyperhomocysteinemia, hemostasis, hypercoagulation.

Тромбозы и их последствия являются глобальной проблемой современного общества. Большое медико-социальное значение имеет своевременная диагностика факторов, повышающих риск тромбообразования, в частности — гипергомоцистеинемии (ГГЦ). Многие аспекты воздействия ГГЦ на систему свертывания крови остаются предметом оживленной дискуссии, несмотря на активное изучение роли повышенного уровня гомоцистеина (ГЦ) в формировании гиперкоагуляционного синдрома [4, 5].

Цель

Изучение состояния тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза, системы естественных антикоагулянтов и фибринолиза при ГГЦ.

Материалы и методы исследования

Обследовано 339 больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями: 55 — с острым инфарктом миокарда (ОИМ), 95 — со стабильным течением ишемической болезни сердца (ИБС), 168 — с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ААНК), в т. ч. 80 — в период нарастания ишемических проявлений, а также 40 пациентов с острым венозным тромбозом (ОВТ) и 80 больных с посттромботическим синдромом (ПТБ). На уро-

вень ГЦ была обследована сопоставимая по полу и возрасту контрольная группа (n = 260). Измерение концентрации ГЦ в плазме проводилось методом жидкостной хроматографии под высоким давлением с флуоресцентной детекцией [3]. Значения ГЦ выше 13,4 мкмоль/л (90 % процентиль в контрольной группе) расценивали как ГГЦ. Коагулологические тесты выполнялись на автоматическом коагулометре ACL-200 производства «Instrumentation Laboratories», США. Помимо активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового теста по Квику (ПТ), тромбинового времени (ТВ), концентрации фибриногена исследовали активность фактора VIII (фVIII) и антитромбина (АТ), антиген и активность фактора Виллебранда (фВ), время Хагеман-зависимого лизиса эуглобулиновой фракции (ХЗЛЭФ) [1]. Тромбоцитарное звено гемостаза изучалось морфофункциональным методом с использованием фазово-контрастного микроскопа [2]. Уровень Д-димера определяли методом латексной агглютинации (реагенты фирмы «Diagnostica Stago, Roche», Франция). Сравнение полученных результатов было проведено с нормативными показателями, принятыми в ла-

боратории свертывания крови Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (РосНИИГТ), а также между группами больных с нормальным и повышенным уровнем ГЦ плазмы. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы «Statistica» 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Частота встречаемости ГЦ во всех обследованных группах больных была достоверно выше, чем в контрольной группе (28 % — при ИБС, 52 % — при ОИМ, 43 % — при ОВТ, 50 % — при ПТБ и 55 % при ААНК против 8,6 % в контроле, $p < 0,001$). Скрининговые показатели коагулограммы (АПТВ, ПТ, ТВ) у большинства пациентов находились в пределах нормы и не демонстрировали взаимосвязи с уровнем ГЦ. В то же время, расширенное исследование позволило проследить более выраженные проагрегантные и прокоагулянтные изменения у боль-

ных с ГЦ. Подавляющее большинство обследованных больных получало антиагрегантные препараты, тем не менее, у них сохранялась активация тромбоцитарного звена гемостаза. Тенденция к более выраженной активации кровяных пластинок выявлена у больных с повышенным уровнем ГЦ. Статистической значимости указанные различия достигали в группе пациентов с ОИМ. У больных с ПТБ отмечена достоверная корреляция между уровнем ГЦ и числом активных форм тромбоцитов ($r = 0,4$, $p = 0,03$). В качестве маркеров прокоагулянтных изменений мы использовали активность фVIII и фВ. У больных с повышенным уровнем ГЦ наблюдалось более выраженное увеличение активности указанных факторов. Так, среднее значение активности фВ у больных с ГЦ при остром венозном тромбозе было в 1,5 раза, а при ПТБ — в 1,2 раза выше, чем у пациентов с нормальным уровнем ГЦ в плазме (таблица 1).

Таблица 1 — Активность факторов VIII и Виллебранда у обследованных больных (M ± SD)

Группы больных	Пациенты без ГЦ		Пациенты с ГЦ	
	активность фVIII, %	активность фВ, %	активность фVIII, %	активность фВ, %
ОВТ	185,4 ± 63,0*	162,0 ± 63,7*	224,2 ± 113,1*	223,6 ± 103,9*
ПТБ	177,4 ± 55,1*	168,4 ± 61,7*	202,3 ± 85,1*	194,5 ± 107,3*
ААНК	155,9 ± 55,1*	149,8 ± 57,5*	163,2 ± 43,2*	162,1 ± 43,1*
ААНК (нарастание ишемии)	156,1 ± 51,8*	139,0 ± 55,6*	157,4 ± 51,2*	162,4 ± 57,3*
ИБС	116,8 ± 45,0	126,0 ± 49,4	142,2 ± 83,9*	133,5 ± 28,5*
ОИМ (2-е сутки)	110,8 ± 73,4	176,5 ± 53,3*	130,8 ± 92,2	204,1 ± 85,0*

Примечание. * $p < 0,05$, достоверное различие с нормой (109,1 ± 37,6 % — норма для фVIII; 99,7 ± 21,9 % — норма для фВ)

Корреляционный анализ выявил значимую связь между уровнем антигена фВ, являющегося маркером эндотелиальной дисфункции, и концентрацией ГЦ в плазме ($r = 0,4$, $p = 0,02$). Тенденция к повышению содержания фВ у больных с ГЦ отчетливо прослеживалась во всех группах больных (таблица 2). Наиболее выраженной она была у па-

циентов с ОВТ и у больных ААНК при нарастании артериальной недостаточности. В обеих указанных группах, а также у пациентов с наличием в анамнезе рецидивирующих артериальных и венозных тромбозов различия в уровне антигена фВ между больными с и без ГЦ достигали пределов статистической значимости.

Таблица 2 — Содержание фактора Виллебранда у обследованных пациентов

Группы больных	VWF: Ag, ед/мл, (M±SD)		
	В целом	Без ГЦ	С ГЦ
ОВТ	1,78 ± 0,60*	1,64 ± 0,64*	1,96 ± 0,59* **
ПТБ	1,88 ± 0,74*	1,86 ± 0,76*	1,91 ± 0,71*
ААНК	1,70 ± 0,60*	1,64 ± 0,78*	1,84 ± 0,53*
ААНК (нарастание ишемии)	1,69 ± 0,62*	1,48 ± 0,57*	1,91 ± 0,66* **
ОИМ	1,53 ± 0,44*	1,46 ± 0,45*	1,75 ± 0,41*
Рецидивирующие тромбозы	2,00 ± 0,70*	1,48 ± 0,83*	2,30 ± 0,57* **

Примечание. * — достоверное различие с нормой (0,98 ± 0,07 ед/мл), $p \leq 0,05$; ** — достоверное различие между группами больных с и без ГЦ, $p \leq 0,05$.

Однозначных данных в пользу гиперфибриногенемии при ГЦ получено не было. В то же вре-

мя оценка фибринолитической активности крови подтвердила предположение о том, что ГЦ спо-

собствует формированию фибринового сгустка, более устойчивого к фибринолизу. У больных с ПТБ при наличии ГЦ лизис сгустка протекал достоверно медленнее по сравнению с больными без ГЦ ($588,0 \pm 336,7$ с против $906,2 \pm 498,5$ с, $p = 0,047$). У больных с ААНК в целом по группе время ХЗЛЭФ было достоверно повышено по сравнению с нормой и при клиническом ухудшении, и вне обострения. Для пациентов с ГЦ были характерны более высокие значения ХЗЛЭФ, причем при клиническом ухудшении течения заболевания различия между подгруппами с нормальным и повышенным уровнем ГЦ достигали статистической значимости ($1020 \pm 480,8$ с против $831,4 \pm 328,0$ с, $p = 0,03$). Существенным фактором тромбообразования является нарушение функционирования антикоагулянтной системы. У больных с нормальным уровнем ГЦ отмечалась компенсаторное повышение активности АТ. При повышенном уровне ГЦ подобного эффекта не отмечалось. Наиболее наглядно угнетение активности АТ при ГЦ проявилось у больных ААНК. У больных с ГЦ активность антитромбина была достоверно ниже, чем у больных без ГЦ как при стабильном течении заболевания ($96,8 \pm 10,2$ против $104,6 \pm 10,5$, $p \leq 0,05$), так и при нарастании ишемии ($106,5 \pm 13,1$ против $113,0 \pm 17,9$, $p \leq 0,05$).

Повышение Д-димера с высокой степенью чувствительности отражает нарушение баланса гемостатических реакций и является доказа-

тельством нарастающей продукции тромбина. Д-димер в концентрации менее 500 нг/мл выявлен у 8 % пациентов с ВТ при наличии ГЦ против 74 % больных без ГЦ ($p = 0,002$). Д-димер в концентрации 1000 нг/мл выявлен у 32 % больных с ГЦ против 16 % больных с нормальным уровнем ГЦ, $p = 0,02$, а в концентрации выше 3000 нг/мл у 60 % больных с ГЦ против 26 % больных без ГЦ ($p = 0,001$).

Заключение

Полученные результаты позволяют утверждать, что повышение уровня ГЦ играет значимую роль в формировании гиперкоагуляционного синдрома. Процессы тромбообразования при ГЦ реализуются через развитие эндотелиальной дисфункции, активацию коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза, снижение активности естественных антикоагулянтов и фибринолиза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний: учеб. пособие; под ред. проф. Н. Н. Петрищева, проф. Л. П. Папаян. — СПб, 1999. — 117 с.
2. Шитикова, А. С. Изменение формы тромбоцитов как показатель их внутрисосудистой активации / А. С. Шитикова // Клинико-лабораторная диагностика предтромботических состояний: сб. ст. — СПб., 1991. — С. 38–52.
3. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability / Y. Fiskerstrand [et al.] // Clinical Chemistry. — 1993. — Vol. 39. — P. 263–271.
4. Loscalo, J. Homocysteine-mediated thrombosis and angiostasis in vascular pathobiology / J. Loscalo // J. Clin. Invest. — 2009. — Vol. 119 (11). — P. 3203–3205.
5. Makris, M. Hyperhomocysteinemia and thrombosis / M. Makris // Clin. Lab. Haem. — 2000. — Vol. 22. — P. 133–143.

УДК 616.155.194.8

ВЕДЕНИЕ ПАЦИЕНТОВ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНЫМИ АНЕМИЯМИ УЧАСТКОВЫМ ТЕРАПЕВТОМ

Ж. Л. Сухих, М. В. Штонда

Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

Клиническая картина железодефицитной анемии (ЖДА) складывается из общих симптомов анемии, обусловленных гемической гипоксией, и признаков тканевого дефицита железа (сидеропенический синдром). Биохимические критерии диагностики латентного дефицита железа (ЛДЖ) и ЖДА рекомендованы ВОЗ. Оптимальная тактика ведения пациентов с ЖДА предполагает насыщающую и поддерживающую терапию препаратами железа. Основные содержащие железо препараты представлены сульфатом железа, глюконатом, хлоридом, fumarатом, глицин сульфатом. Комплексный препарат Тотема содержит двухвалентное железо в комплексе со стимулятором его абсорбции органической глюконовой кислотой. При выборе содержащего железо препарата врачи участковые терапевты ориентируются на возможности пациента приобрести препарат на курс лечения, переносимость лекарственного средства и на свой собственный опыт.

Ключевые слова: железодефицитная анемия, препараты, содержащие железо, Тотема.

THERAPY MANAGEMENT OF PATIENTS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA BY A DIVISIONAL THERAPIST

Zh. L. Suhih, M. V. Shtonda

State Educational Institution Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk

IDA clinical picture consists of common symptoms of anemia caused by hemic hypoxia, and signs of tissue iron deficiency (sideropenic syndrome). Biochemical criteria for diagnosis of IDA and LID (latent iron deficiency) are rec-

ommended by WHO. Optimal tactics of patients with IDA involves saturating and maintenance therapy with iron. The main iron-containing products are iron sulfate, gluconate, chloride, fumarate, glycine sulfate. The integrated medicine Tot'hema contains ferrous iron with its stimulant absorption of organic gluconic acid. When choosing a iron-containing medication divisional therapists focused on the patient's chances to get the drug for a course of treatment, tolerability of the drug and on their own experience.

Key words: iron deficiency anemia, iron-containing products, Tot'hema

Анемии являются актуальной проблемой современного здравоохранения и выявляются у 10–20 % населения [8]. По мнению Ф. Ю. Копылова (2011), данная патология сопровождает человека с древних времен. Однако, за последние несколько столетий отмечены значительные успехи в понимании и изучении патофизиологии анемий. В настоящее время проводятся крупные исследования, посвященные изучению роли анемии в развитии и течении различных заболеваний.

По данным ВОЗ, среди анемий лидирующая роль принадлежит ЖДА, на нее приходится 80 % от всех анемий. Дефицит железа выявляется у 30 % населения планеты (ВОЗ, 1998). В тоже время, скрытый дефицит железа регистрируется в 2 раза чаще, чем ЖДА [1]. Около 1,8 млрд человек в мире страдают ЖДА, а 3,6 млрд имеют ЛДЖ. Наиболее распространена ЖДА у детей раннего возраста (до 1 года) и беременных женщин [8].

Согласно определению ВОЗ, анемия регистрируется у взрослых женщин при снижении концентрации гемоглобина в крови ниже 12 г/дл, а у мужчин — ниже 13 г/дл. Применение критерия 12 г/дл для женщин позволяет включить в число страдающих анемией существенно большее число лиц по сравнению с мужчинами. Этот факт нашел свое отражение в исследовании М. J. Sarnak (2002), в котором выявлено, что распространенность ЖДА у женщин в 3 раза превышает таковую у мужчин — 13 и 4,8 %, соответственно [11].

С ЖДА чаще приходится сталкиваться врачу-интернисту. Разнообразная клиническая симптоматика ЖДА требует от врачей различных специальностей, и, прежде всего, участковых терапевтов, современной и правильной диагностики анемического синдрома [3]. Участковому терапевту необходимо:

— заподозрить синдром ЖДА на основании картины периферической крови;

— обосновать назначение дополнительных исследований для подтверждения железодефицитного характера анемии;

— правильно трактовать полученные результаты лабораторного обследования (уровень сывороточного железа и др.);

— построить программу диагностического поиска для выявления заболевания, лежащего в основе ЖДА;

— обосновать программу ведения больных ЖДА с учетом причины, тяжести анемии, характера сопутствующей патологии и т. д.;

— обосновать необходимость консультации смежных специалистов (хирурги, гинекологи, ЛОР-врачи и др.) при ведении больных ЖДА;

— назначить патогенетическую терапию препаратами железа;

— обосновать выбор лекарственного препарата железа для коррекции анемии;

— оценить эффективность и переносимость назначенного препарата железа;

— обосновать программу профилактических мероприятий у больных ЖДА с учетом наличия факторов риска рецидива ЖДА [3].

Наиболее частыми причинами ЖДА, которые обязательно должен помнить и учитывать врач-интернист [3, 4]:

1) *хронические кровопотери различной локализации:*

— желудочно-кишечные (гастроэзофагальная рефлюксная болезнь);

— эрозивно-язвенные поражения желудка и 12-перстной кишки, опухоли желудка и толстой кишки, терминальный илеит, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, дивертикулиты, кровоточащий геморрой и др.);

— кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода;

— маточные (меноррагии различной этиологии, миома, эндометриоз, внутриматочные контрацептивы);

— носовые (наследственная геморрагическая телеангиэктазия и другие геморрагические диатезы, кровоточивость десен);

— почечные (IgA-нефропатия, геморрагический нефрит, опухоли почек, перманентный внутрисосудистый гемолиз);

— легочные (идиопатический легочный гемосидероз);

— ятрогенные и искусственные кровопотери (частые кровопускания и заборы крови для исследований, лечение гемодиализом, донорство и др.);

2) *нарушения всасывания железа:*

— энтериты различного генеза;

— синдром недостаточности всасывания;

— резекция тонкой кишки;

— резекция желудка с выключением 12-перстной кишки;

3) *повышенная потребность в железе:*

— беременность, лактация;

— интенсивный рост и пубертатный период;
— В12-дефицитная анемия, леченная витамином В12;

4) нарушение транспорта железа (*гипопротеминемии различного генеза*);

5) алиментарная недостаточность [3, 4].

Клиническая картина ЖДА складывается из общих симптомов анемии, обусловленных гемической гипоксией, и признаков тканевого дефицита железа (сидеропенический синдром).

Общеанемический синдром. Люди с пониженным гемоглобином могут чувствовать вялость, слабость, быструю утомляемость, головокружение, головные боли (чаще в вечернее время), одышку при физической нагрузке, ощущение сердцебиения, синкопальные состояния, мелькание «мушек» перед глазами при невысоком уровне артериального давления, часто наблюдается умеренное повышение температуры, нередко сонливость днем и плохое засыпание ночью, раздражительность, нервозность, плаксивость, снижение памяти и внимания, ухудшение аппетита.

Сидеропенический синдром. У людей с дефицитом железа отмечается сухость кожных покровов, иногда чувство стягивания кожи, шелушение, трещины кожи на руках и ногах, появляются участки мацерации на травмированных частях кожи. Пациенты предъявляют жалобы на интенсивное выпадение волос, истончение и повышенную ломкость волос. Характерно изменение ногтей — ломкость, слоистость, поперечная исчерченность, ногти уплощаются, становятся ложкообразными. При дефиците железа нарушается регенерация слизистой желудочно-кишечного тракта, что проявляется глосситом, внешне язык представлен атрофией слизистой, исчерчен, приобретает «малиновый» цвет. Появляются трещины в углах рта — ангулярный стоматит. Пациенты жалуются на извращение вкуса (пристрастие к мелу, глине, песку) и нарушение обоняния. Среди других проявлений сидеропении можно отметить мышечную слабость, слабость сфинктеров — ночное недержание мочи [8].

Для диагностики ЖДА используются следующие гематологические показатели [4]:

— HGB (Hb) — содержание гемоглобина;

— RBC — количество эритроцитов;

— Ht (HCT) — гематокрит — отражает долю эритроцитов в общем объеме крови;

— ЦП — цветной показатель — отражает относительное содержание Hb в эритроците (при ЖДА ЦП < 0,85);

— MCV — mean corpuscular volume (средний объем эритроцитов, норма: 80–95 фл); MCV снижается при ЖДА;

— MCH — mean cell hemoglobin (среднее содержание Hb в эритроците, норма: 27–31 пг), при ЖДА MCH < 24 пг;

— MCHC — mean cell Hb concentration (средняя концентрация Hb в эритроците, норма: 30–38 г/дл), при ЖДА MCHC < 33 г/дл;

— RDW — red cell distribution width (показатель анизоцитоза эритроцитов, норма 11,5–14,5 %), при ЖДА RDW повышен.

При трактовке результатов анализа крови следует обязательно обращать внимание не только на цветовой показатель, но также и на морфологическую характеристику эритроцитов (гипохромия эритроцитов и ее выраженность, микроцитоз).

В клетках слизистой оболочки железо находится в цитозоле. Часть железа, предназначенная для метаболизма в других тканях, переносится через базолатеральную мембрану клетки и связывается с трансферрином, основным транспортным белком железа в крови. Данный белок может связывать две молекулы железа. Общая связывающая способность сыворотки, обусловленная белком-трансферрином, равна 250–350 мкг %. В норме трансферрин насыщен железом на 1/3. В клетках железо откладывается в виде ферритина — комплекса белка апоферритина с железом. В одной молекуле ферритина находится до 4,5 тыс. атомов железа. При высоких концентрациях железа синтез апоферритина усиливается. В норме в организме содержится около 4 г железа, из них — 3 г в составе гемоглобина, миоглобина, каталазы, дыхательных пигментов или ферментов. Печень — основное место хранения железа, всасывающегося в кишечнике. При небольших запасах железа оно хранится в виде ферритина [9].

Поэтому для оценки запасов железа в организме используют также определение ферритина сыворотки. У здоровых женщин уровень ферритина сыворотки равен 32–35 мкг/л, при ЖДА он снижается до 12 мкг/л и менее. Однако содержание ферритина сыворотки не всегда отражает запасы железа, и зависит также от скорости освобождения ферритина из тканей и плазмы.

Поэтому наряду с определением концентрации железа в сыворотке диагностическое значение имеет оценка общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС), отражающей степень «голодания» сыворотки и насыщения трансферрина железом. У больных ЖДА отмечаются повышение ОЖСС, значительное повышение латентной железосвязывающей способности и уменьшение процента насыщения трансферрина [6].

Основными лабораторными признаками ЖДА, отличающимися ее от других патогенетических вариантов анемий следующие:

- 1) низкий цветовой показатель;
- 2) гипохромия эритроцитов, микроцитоз;
- 3) снижение уровня сывороточного железа;

4) повышение общей железосвязывающей способности;

5) снижение уровня ферритина.

О тяжести течения болезни судят по уровню гемоглобина:

— легкая степень анемии характеризуется снижением гемоглобина до 110–90 г/л;

— средняя степень — от 89 до 70 г/л;

— тяжелая степень — 69 г/л и ниже.

Во всех случаях железодефицитной анемии необходимо установить непосредственную причину возникновения данного состояния и по возможности ликвидировать ее (чаще всего устранить источник кровопотери или провести терапию основного заболевания, осложнившегося сидеропенией).

Железо — жизненно необходимый микронутриент. Обеспеченность железом, равно как и другими жизненно необходимыми микронутриентами, является основой здорового рациона питания в любом возрасте: у детей, у взрослых, и у пожилых. При установленном дефиците железа, пациент нуждается не только в коррекции диеты, но и в лечении с использованием эффек-

тивных и безопасных препаратов железа. Нормальная обеспеченность железом таких пациентов улучшает качество и длительность жизни [2].

Терапевтический план лечения ЖДА предусматривает 100 % дозировку препаратов железа в течение всего курса. В рандомизированных исследованиях установлено, что эффективность такого лечения на 25 % выше по сравнению со ступенчатым терапевтическим планом, оценка эффективности проводилась по нормализации сывороточного ферритина, характеризующего запасы железа в депо.

При выборе содержащего железо препарата следует ориентироваться не на содержание в нем общего количества соединений железа, а на количество элементарного железа [7, 8].

Для расчета необходимого количества препарата необходимо знать содержание элементарного железа (Fe^{2+} или Fe^{3+}) в данной лекарственной форме препарата (капля, таблетка, драже, флакон) и число штук в упаковке [8].

Препараты железа для терапии ЖДА представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Препараты железа для терапии железодефицитной анемии [2]

Препарат	Фармакологическая форма железа	Элемент. железо	Режим приема
I поколение			
Ферроплекс	50 мг сульфата железа (II)	16 мг	1–2 др./сут
Актиферрин	113,85 мг сульфата железа (II)	34,5 мг	1 капс. 2–3 р/сут
Феррофольгамма	112,6 мг сульфата железа (II)	37 мг	1 капс. 3 р/сут
Фефол	150 мг сульфата железа (II)	50 мг	1 капс./сут
Конферон	250 мг сульфата железа (II)	50 мг	1–2 капс. 3 р/сут
Феррокаль	200 мг сульфата железа (II)	67 мг	2–6 таб./сут
Тардиферон	256 мг сульфата железа (II)	80 мг	1–2 таб. 1–2 р/сут
Сорбифер дурулес	320 мг сульфата железа (II)	100 мг	1 др. 1–2 р/сут
Ферроградумет	325 мг сульфата железа (II)	105 мг	1 таб./сут
Гемофер	325 мг сульфата железа (II)	105 мг	1 таб./сут
II поколение			
Ферронат	200 мг фумарата железа	67 мг	1 капс. 3 р/сут
Хеферол	350 мг фумарата железа	115 мг	1 капс. 3 р/сут
III поколение			
Ферлатум	800 мг железо протеин сукциниллат	40 мг	1 амп./сут
Тотема	360 мг глюконата железа, в синергидной композиции с глюконатом марганца и глюконатом меди	50 мг	2–4 амп./сут
Гемостимуллин	246 мг железа лактата	60 мг	1 таб. 3 р/сут

Выбирая содержащий железо препарат, врач ориентируется на возможности пациента приобрести препарат на курс лечения, переносимость препарата и на свой собственный опыт.

В железосодержащие препараты часто включены аскорбиновая кислота, усиливающая всасывание железа и улучшающая биодоступность препарата, а также витамины — фолиевая кислота, цианокобаламин. Активные компоненты некоторых препаратов находятся в специальной нейтральной оболочке, что обеспечивает

их всасывание, главным образом в верхнем отделе тонкой кишки. Отсутствие местного раздражающего действия на слизистую желудка способствует хорошей переносимости препарата со стороны желудочно-кишечного тракта.

Практикующие врачи отдают предпочтение лекарственным препаратам, назначаемым для приема внутрь. Основным показанием для парентерального введения препаратов железа является наличие патологии кишечника с нарушением всасывания.

В случаях непереносимости солевых препаратов двухвалентного железа, являющихся на сегодняшний день наиболее эффективными в лечении анемии и восполнении депо железа, возможно использование препаратов трехвалентного железа в виде гидроксид-полимальтозного комплекса.

Оптимальная тактика ведения пациентов с ЖДА предполагает насыщающую и поддерживающую терапию препаратами железа. Необходимо подчеркнуть, что адекватный прирост показателей гемоглобина у больных ЖДА может быть обеспечен поступлением в организм от 30 до 100 мг элементарного железа [7]. Так как при ЖДА всасывание железа увеличивается по сравнению с нормой, необходимо назначать от 100 до 300 мг элементарного железа в сутки.

При правильном лечении прогноз ЖДА благоприятный. Обычно подъем уровня гемоглобина отмечается только на третьей неделе после начала терапии и достигает нормальных значений через 5–6 недель. Эти сроки ответа на терапию препаратами железа необходимо учитывать для правильной интерпретации результатов лечения. Продолжительность лечения ЖДА определяется последовательной нормализацией гемоглобина, ферментного пула и запасов железа в организме, на что необходимо не менее 2–3 мес. В случае сохранения причины дефицита железа (меноррагии, патология кишечника и др.) возникает необходимость постоянной поддерживающей дозы железа (50–100 мг) после проведения основного курса лечения [5].

Наряду с препаратами железа в профилактике ЖДА имеет значение диета, включающая мясные продукты (телятину, печень), продукты растительного происхождения (петрушку, горох, шпинат, сушеные абрикосы, чернослив, гранаты, изюм, рис, гречневую крупу, хлеб) — продукты со значительным содержанием железа, а также продукты, искусственно обогащенные железом [5, 7, 8].

Необходимо помнить, что всасывание железа из препаратов, содержащих железо (ПСЖ), может уменьшаться под влиянием содержащихся в некоторых пищевых продуктах веществ — фитинов (рис, соя), фосфатов (рыба, морепродукты), танина (чай, кофе) [7]. Всасывание железа из ПСЖ в виде солей ухудшается при одновременном приеме ряда медикаментов (тетрациклины, антациды, соли кальция и магния). С учетом этого следует рекомендовать прием ПСЖ в различное время с другими вышеуказанными медикаментами. В тоже время, препараты ПЖК, в частности, гидроксиполимальтозный комплекс, лишены подобных недостатков, поскольку пищевые продукты и медикаменты не оказывают влияния на всасываемость железа (в виде трехвалентной формы) из железосодержащих комплексов [3].

Комплексный антианемический мультиэлементный препарат Тотема оптимально соответствует физиологии обмена железа, т. к. содержит

двухвалентное ферро-железо в комплексе со стимулятором его абсорбции органической глюконовой кислотой. В состав данного препарата также входит микроэлемент — медь, обладающий синергетическим по отношению к железу действием. Медь в составе медьсодержащего белка плазмы крови церулоплазмينا обеспечивает окисление абсорбированного двухвалентного ферро-железа в трехвалентное, что является неременным условием его связывания трансферрином и последующего транспорта в ткани.

Препарат Тотема представляет собой питьевую суспензию в ампулах по 10 мл. Одна ампула содержит железа глюконат в количестве, равном 50 мг элементарного железа, марганца глюконат в количестве, равном 1,33 мг элементарного марганца, и меди глюконат в количестве, равном 0,7 мг элементарной меди. Содержимое ампул растворяют в воде (с сахаром или без) или в любой другой пищевой жидкости (кроме чая, кофе и жидкостей, содержащих спирт). Желательно принимать препарат натощак.

Медь и марганец, входящие в состав Тотемы, являются коферментами супероксиддисмутазы, которая предохраняет молодые эритроциты от повреждающего действия свободных радикалов, в частности, ионизированного кислорода. Это способствует купированию ЖДА, снижению побочных действий ферротерапии, связанных с оксидантным стрессом.

Препарат Тотема показан для коррекции железодефицитных состояний (прелатентного и латентного) и лечения ЖДА, обусловленной кровопотерями алиментарного происхождения, при повышенных потребностях организма в железе в период интенсивного роста, при беременности и лактации. Благодаря эксклюзивной композиции и содержанию ряда эссенциальных микроэлементов препарат Тотема показан для профилактики и лечения микроэлементозов — патологических состояний, связанных с нарушением обмена микроэлементов в организме, частной формой которых является ЖДА.

Противопоказаниями к применению препарата Тотема являются патологические состояния, при которых наблюдается повышенная аккумуляция железа в организме. К их числу относятся идиопатический гемохроматоз, приобретенный гемохроматоз, гипо- и апластическая анемия, некоторые наследственные заболевания, связанные с нарушением обмена меди, в частности болезнь Вильсона-Коновалова, синдром Менкеса, наследственный медный токсикоз.

Взрослым и подросткам старше 12 лет препарат Тотема при ЖДА может быть назначен в дозе 100–200 мг элементарного железа или по 2–4 ампулы в сутки, что соответствует примерно 30 мг реально абсорбируемого железа.

Продолжительность курсового приема препарата Тотема — 3–6 мес. Тотема не вызывает серьезных побочных реакций. Как и другие железосодержащие средства, препарат окрашивает кал в черный цвет за счет остаточного невосав-

шегося в кишечнике железа. Может отмечаться временный эффект окрашивания зубов и языка, который быстро устраняется. Также могут наблюдаться явления тошноты или диареи.

Учитывая уникальную композицию незаменимых микроэлементов, входящих в состав Тотемы, этот препарат также показан для профилактики и лечения патологических состояний, связанных с нарушением обмена микроэлементов в организме, частной формой которых является ЖДА [4].

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Железодефицитная анемия и выбор препарата для ее коррекции / А. Л. Верткин // РМЖ. — 2010. — Т. 18, № 5. — С. 27–32.
2. Громова, О. А. Нежелательные эффекты сульфата железа в акушерской, педиатрической и терапевтической практике / О. А. Громова, И. Ю. Торшин, А. К. Хаджидис // Земский врач. — 2010. — № 2. — С. 18–21.
3. Дворецкий, Л. И. Железодефицитная анемия в практике терапевта / Л. И. Дворецкий // РМЖ. — 2009. — Т. 17, № 23. — С. 32–39.
4. Коноводова, Е. Н. Железодефицитные состояния: кому и когда назначить Тотему? / Е. Н. Коноводова // Фарматека. — 2005. — № 6. — С. 11–13.
5. Котлов, Ф. Ю. Анемии в кардиологической практике / Ф. Ю. Котлов, Д. Ю. Шкочкин // Трудный пациент. — 2011. — № 4. — С. 41–46.
6. Лебедева, В. А. Патогенез и терапия железодефицитной анемии беременных / В. А. Лебедева, В. М. Пашков // Трудный пациент. — 2011. — № 2–3. — С. 52–56.
7. Постникова, С. Л. Клинические рекомендации по коррекции железодефицита у различных групп пациентов / С. Л. Постникова, Н. В. Мальшева, Т. Б. Касатова // РМЖ. — 2010. — Т. 18, № 30. — С. 15–18.
8. Цветкова, О. А. Медико-социальные аспекты железодефицитной анемии / О. А. Цветкова // РМЖ. — 2009. — Т. 17, № 5. — С. 41–44.
9. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчевыводящих путей: прак. рук.: пер. с англ. / Ш. Шерлок, Дж. Дули; под ред. З. Г. Апросиной, Н. А. Мухина. — М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. — 864 с.
10. Anemia as a risk factor cardiovascular disease in The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study / M. I. Sarnak [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 2002. — Vol. 40. — P. 27–33.