

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»**

**ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ
THE BULLETIN OF HEMATOLOGY**

Том XVII № 4 2021

Ежеквартальный научно-практический журнал
Основан в сентябре 2004 года

Главный редактор
Заслуженный деятель науки РФ
Доктор медицинских наук
профессор
С.С. Бессмельцев

Санкт-Петербург
2021

Редакционная коллегия:

С. С. Бессмельцев (главный редактор), заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕ, Санкт-Петербург;

А. Н. Богданов, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

Л. Н. Бубнова, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

Т. В. Глазнова (ответственный секретарь), доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;

С. В. Грицаев, доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;

С. А. Гусева, доктор медицинских наук, профессор, г. Киев (Украина);

И. Л. Давыдкин, доктор медицинских наук, профессор, г. Самара;

А. Ю. Зарицкий, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

Н. М. Калинина, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

Л. П. Папаян, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;

Р. М. Рамазанова, доктор медицинских наук, профессор, г. Алматы (Республика Казахстан);

Н. А. Романенко, доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;

О. А. Рукавицын, доктор медицинских наук, профессор, г. Москва;

В. Н. Чеботкевич, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург.

Редакционный совет:

К. Т. Бобоев, доктор медицинских наук, профессор, г. Ташкент (Республика Узбекистан)

А. К. Голенков, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заслуженный врач РФ, г. Москва;

И. Г. Дуткевич, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, Санкт-Петербург;

В. И. Мазуров, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Санкт-Петербург;

И. В. Поддубная, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва;

Т. И. Поспелова, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, г. Новосибирск;

А. Г. Румянцев, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва;

Е. Н. Паровичникова, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный работник здравоохранения РФ.

Зав. редакцией — кандидат медицинских наук, доцент

Е. Р. Шилова, тел.: (812) 717-58-57

Ответственный секретарь — доктор медицинских наук

Т. В. Глазнова, тел.: (812) 717-08-90, факс: (812) 717-20-87

Импакт-фактор РИНЦ: 2-х летний 0,346; 5-летний 0,455

Адрес редакции:

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16

E-mail: bloodscience@mail.ru

Сайт: www.bloodscience.ru

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

При перепечатке материалов ссылка на журнал «Вестник гематологии» обязательна.

Мнение членов редакционной коллегии не всегда совпадает с мнением авторов статей.

Обложка и художественное оформление *М. В. Келер*

Компьютерная верстка *М. В. Келер*

Журнал зарегистрирован Северо-Западным окружным межрегиональным территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Министерства Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средствам массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации ПИ № 2-7271 от 28 мая 2004 г.

Подписано в печать 02.06.2021 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ 88.

Издательство РосНИИГТ, 193024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

Отпечатано в ООО «Комильфо», Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23.

18 +

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕДОВАЯ СТАТЬЯ

Кострома И.И., Сабитова Р.Р., Замотина Т.Б., Грицаев С.В., Бессмельцев С.С.

МОБИЛИЗАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА В ПЕРИФЕРИЧЕСКУЮ КРОВЬ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ..... 4

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Кузнецов Ю.Н., Голубовская И.К., Кулагин А.Д.

ТЕЛОМЕРОПАТИИ КАК МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНАЯ ПРОБЛЕМА.....15

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

Зенина М.Н., Шилова Е.Р., Черныш Н.Ю.

СОВРЕМЕННЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ – ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ..... 24

ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

Папаян Л.П.

БОЛЕЗНЬ ВИЛЛЕБРАНДА: ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ (ЛЕКЦИЯ)..... 32

II НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»43

CONTENTS

EDITORIAL ARTICLE

Kostroma I.I., Sabitova R.R., Zamotina T.B., Gritsaev S.V., Bessmeltsev S.S.

MOBILIZATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM BONE MARROW INTO PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA.....4

REVIEW OF LITERATURE:

Kuznetsov Yu.N., Golubovskaya I.K., Kulagin A.D.

TELOMEROPATHIES AS A MULTIDISCIPLINARY PROBLEM.....15

FOR PRACTICE

Zenina M.N., Shilova E.R., Chernysh N.Y.

MODERN HEMATOLOGICAL ANALYZERS – OPPORTUNITIES AND LIMITATIONS.....24

HEMATOLOGY: YESTERDAY, TODAY, TOMORROW

Papayan L.P.

VON WILLEBRAND DISEASE: ETIOLOGY, PATHOGENESIS, PECULIATARY OF LABORATORY DIAGNOSTICS (LECTURE)32

Кострома И.И., Сабитова Р.Р., Замотина Т.Б., Грицаев С.В., Бессмельцев С.С.

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург

МОБИЛИЗАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА В ПЕРИФЕРИЧЕСКУЮ КРОВЬ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Резюме. В библиотеках Pubmed и Medline выполнен поиск литературных источников, в которых были затронуты проблемы заготовки аутотрансплантата у больных множественной миеломой (ММ), а также проанализирован собственный опыт применения режима мобилизации (РМ) с разной интенсивностью цитостатической составляющей. Изучены данные 79 публикаций, посвященные данной теме. Анализ литературных данных свидетельствуют о выраженной мобилизационной активности режима мобилизации (РМ) с включением высокодозного циклофосфана (ЦФ). Менее токсичная схема, цитостатическая составляющая которой представлена винорелбином, привлекательна по причине возможности спрогнозировать в большинстве случаев сроки инициации первого сеанса лейкоцитафереза и низкой частоты осложнений.

Результаты собственных исследований в целом соответствуют цифрам других авторов. Признавая клиническую потребность в РМ без введения цитостатиков, проанализированы сообщения других авторов о мобилизационном потенциале комбинации Г-КСФ с плериксафором. Сообщается о короткой продолжительности схемы (не более 5 дней), низкой частоте случаев с повторным введением плериксафора и редких эпизодах токсических осложнений. Таким образом актуальность проблемы эффективности РМ без назначения цитостатических препаратов является несомненно актуальной.

Ключевые слова. Множественная миелома, мобилизация стволовых клеток, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Kostroma I.I., Sabitova R.R., Zamotina T.B., Gritsaev S.V., Bessmeltsev S.S.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia

MOBILIZATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM BONE MARROW INTO PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Abstract. In the Pubmed and Medline libraries, a search was made for literature sources that touched upon the problems of preparing an autograft in patients with multiple myeloma (MM), and also analyzed our own experience of using a mobilization (RM) regimen with different intensities of the cytostatic component. The data of 79 publications devoted to this topic have been studied. Analysis of the literature data indicate a pronounced mobilization activity of the mobilization mode (RM) with the inclusion of high-dose cyclophosphamide (CP). A less toxic scheme, the cytostatic component of which is represented by vinorelbine, is attractive due to the ability to predict in most cases the timing of the initiation of the first session of leukocytapheresis and the low incidence of complications.

The results of our own research generally correspond to the figures of other authors. Recognizing the clinical need for RM without the introduction of cytostatics, the reports of other authors on the mobilization potential of the combination of G-CSF with plerixaphor were analyzed. A short duration of the regimen (no more than 5 days), a low incidence of repeated administration of plerixaphor, and rare episodes of toxic complications have been reported. Thus, the urgency of the problem of the effectiveness of RM without the appointment of cytostatic drugs is undoubtedly relevant.

Key words. Multiple myeloma, stem cell mobilization, autologous hematopoietic stem cell transplant.

Введение

Оптимальных режимов мобилизации, адаптированных к клинико-гематологическим показателям больных и биологическим характеристикам болезни, в частности ММ, в настоящее время нет. Объективным отражением данного факта являются неудачные мобилизации, частота которых варьирует от 5 до 40% [1-5]. Причиной данного

события является то, что эффективность мобилизации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), является совокупностью множества факторов, а именно: возраст, сопутствующие заболевания, клеточность костного мозга (КМ), активность болезни, состав и объем ранее проведенной специфической терапии, состояние клеток гемопоэтической ниши, интенсивность РМ, сроки заготовки

ГСК, модель сепаратора клеток крови и профессиональная подготовка команды. [7,8].

Наибольшее распространение в качестве РМ получили внутривенные инфузии циклофосфана (ЦФ) и/или подкожные инъекции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ).

Введение Г-КСФ по 10 мкг/кг/день в виде двух, равных по объему вводимого препарата, инъекциях обеспечивает заготовку субоптимального количества CD34+ клеток, соответствующего требованиям, предъявляемых к трансплантату для выполнения одиночной АутоТГСК [9-11]. Важная составляющая черта данного РМ – редкие эпизоды гематологической токсичности, фебрильной нейтропении и госпитализаций [12]. Вместе с тем высокая частота неудачных мобилизаций, особенно при планировании двойной АутоТГСК, и необходимость преодоления негативного влияния на костномозговое кроветворение ранее назначаемых алкилирующих, иммуномодулирующих препаратов и/или моноклональных антител обосновывают целесообразность модификации данного РМ посредством дополнительного назначения цитостатиков и/или плериксафора по типу on demand [13-15], что, в частности, подробно представлено в отечественных публикациях [16].

Эффект мобилизации ГСК из костного мозга (КМ) в периферическую кровь (ПК) при сочетанном назначении цитостатиков и Г-КСФ опосредован нарушением взаимодействия молекул адгезии VCAM-1 и CXCR4 с их лигандами и экспрессии SDF-1 [17-19]. Дополнительным фактором является стимуляция кроветворения вследствие постцитостатической аплазии КМ.

Комбинированный РМ не только повышает вероятность достижения целевого уровня CD34+ клеток в ПК (10–30/мкл), но и существенно изменяет качественный состав заготавливаемой взвеси. Так С. Cesana с соавт. [20] установили, что содержание гранулоцитарных колониобразующих клеток и клеток-предшественниц долгосрочных культур (long-term culture initiating-cells) было значимо выше в случае применения комбинации ЦФ с Г-КСФ по сравнению с монотерапией Г-КСФ. Более того, различие было обнаружено и после введения разных видов Г-КСФ [21,22]. Предполагается, что в основе данного биологического феномена лежит различие механизмов воздействия на клетки КМ и межклеточные взаимодействия. В то же время отсутствие улучшения бессобытийной выживаемости и общей выживаемости (ОВ) при включении ЦФ в режим предтрансплантационной подготовки свидетельствует о том, что препарат не оказывает “санирующего” воздействия на костномозговое кроветворение [23,24].

Циклофосфан в мобилизации ГСК

Циклофосфан в составе РМ назначается в дозе

1–7 г/м². Наиболее удачными представляются промежуточные дозы 3–4 г/м², эффективность которых выше низких, а токсичность ниже высоких доз [25-27]. Вместе с тем включение ЦФ не всегда гарантирует успешную мобилизацию. Неудачная (менее 2x10⁶ CD34+ клеток/кг) и субоптимальная (2-5x10⁶ CD34+ клеток/кг) заготовка аутотрансплантата ассоциированы с возрастом ≥ 60 лет, предшествующим назначением леналидомида, развитием гематологической токсичности в индукционном периоде. В то же время применение промежуточных доз снижает частоту неудачных заготовок у больных, получавших иммуномодуляторы [25,28,29]. Так М. Hamadani с соавт. [25] обнаружили, что у больных ММ, получавших леналидомид, процент неудач был выше при использовании малых доз ЦФ: 20% против 0% при назначении промежуточных доз. Более того включение в состав РМ промежуточных доз ЦФ сопровождалось не только повышением уровня CD34+ клеток в аутотрансплантате, но и укорочением длительности периода постцитостатической цитопении, улучшением безпрогрессивной выживаемости (БПВ) и ОВ.

Наряду с несомненным улучшением качества аутотрансплантата, существует и целый ряд негативных эффектов, связанных с назначением высокодозного ЦФ. Это невозможность спрогнозировать оптимальные сроки заготовки, необходимость длительной госпитализации из-за риска возникновения токсических осложнений, осуществление клинико-лабораторного мониторинга, проведение гидратации и введение уропротекторов. Не исключен и мутагенный эффект с развитием вторичного миелодиспластического синдрома через несколько лет после АутоТГСК.

Винорелбин в мобилизации ГСК

В качестве возможной альтернативы для мобилизации ГСК многими гематологами рассматривается винорелбин – полусинтетический винка алкалоид, применяемый для лечения больных солидными опухолями и ММ [30-33]. Привлекательной чертой винорелбина является отсутствие необходимости пребывания больного на больничной койке, проведения гидратации, назначения антиэметиков и уропротекторов, а также крайне низкая частота эпизодов фебрильной нейтропении. Важным фактором является предсказуемость сроков максимальной мобилизации CD34+ клеток в ПК.

М. Bargetzi с соавт. [33] одними из первых описали опыт применения винорелбина для мобилизации ГСК у больных ММ высокого риска. Винорелбин назначался внутривенно по 35 мг/м² в течение 5–10 минут. Введение Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг, разделенной на утреннюю и вечернюю инъекции, начинали с 4 дня и продолжали до окончания аферезов ГСК. Аферезы иницииро-

вали при уровне CD34+ клеток в ПК $>20 \times 10^6$ /л. Следует особо подчеркнуть, что данный уровень достигался у всех больных на 8 день. Объем заготовленных CD34+ клеток составил $6,2-36 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг (медиана $11,1 \times 10^6$ /кг), что превышало целевой уровень в $>4 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг. Приживление аутотрансплантата после кондиционирования Mel200 наступило у всех больных. Абсолютное число нейтрофилов $>0,5 \times 10^9$ /л и тромбоциты $>20 \times 10^9$ /л были зафиксированы на 11 (10–15) и 12 (10–15) дни соответственно. Эффективность винорелбина была сопоставима с результатами заготовки после введения ЦФ в дозе 4 г/м^2 , но число введений Г-КСФ было существенно ниже.

Безопасность, эффективность и предсказуемость сроков заготовки аутотрансплантата после введения винорелбина и Г-КСФ были подтверждены результатами заготовки трансплантата у 223 больных ММ, из которых у 99% удалось выполнить лейкоцитаферез, у 95% инициировать процедуру на 8 день и у 77% достаточным было одного сеанса афереза. В многофакторном анализе было установлено, что причиной низкой клеточности аутотрансплантата были предшествующее назначение леналидомида и возраст больного. Наиболее частым осложнением РМ была оссалгия (45%), причиной которой рассматривается введение Г-КСФ. Назначение винорелбина было ассоциировано с дискомфортом в животе (13%), гриппоподобным синдромом (4%), жжением в стопах и руках (1%), тромбозами глубоких вен нижних конечностей (1%) и флебитами (1%). Осложнения, связанные с введением винорелбина, явились причиной госпитализации двух больных: фебрильная нейтропения и почечная недостаточность у одного больного и боли в животе и запор у другого [30].

Сопоставимая эффективность ЦФ и винорелбина обосновывает возможность их сочетанного назначения для заготовки аутотрансплантата у больных неблагоприятными вариантами ММ. Так М. Annunziata с соавторами [32] в первый день мобилизации вводили винорелбин 25 мг/м^2 , а во второй – ЦФ в дозе $1,5 \text{ г/м}^2$. Месна при этом не назначалась. С 4 дня начинали подкожные инъекции Г-КСФ по 5 мкг/кг дважды в день. При сравнении результатов с данными контрольной группы, в которой был использован ЦФ 4 г/м^2 , значимых различий по количеству дней введения Г-КСФ, проценту успешных мобилизаций, объему заготовленных CD34+ клеток и числу аферезов не было выявлено. Вместе с тем монотерапия ЦФ сопровождалась большей частотой осложнений по сравнению с комбинированным режимом: лихорадка 44% и 0% ($p < 0,001$) и частота госпитализаций из-за фебрильной нейтропении 19% и 0% соответственно. В настоящее время рассматри-

вается целесообразность дополнительного назначения плериксафора в случае недостаточного количества заготавливаемых CD34+ клеток [34].

Приоритетность комбинированных РМ с включением цитостатиков объясняется химиочувствительностью к ним, циторедуктивным эффектом и значимым мобилизационным потенциалом [35–37].

Вместе с тем необходимо еще раз подчеркнуть целый ряд недостатков включения химиопрепаратов в состав РМ. Основные из них – невозможность корректно спрогнозировать сроки инициации лейкоцитаферезов и высокая частота токсических осложнений. В связи с этим небезосновательным является вновь возникший интерес к использованию Г-КСФ. Отчасти это обусловлено не оправдавшимися надеждами на saniрующее КМ действие ЦФ [38,39]. С другой стороны, привлекательным представляется короткий срок введения Г-КСФ, в течение 4 дней, с усилением его мобилизационного потенциала дополнительным назначением плериксафора.

CD 34+ клетки и мобилизация ГСК

Проблема выполнения эффективной заготовки аутотрансплантата сопряжена с необходимостью постоянного анализа клинических и лабораторных показателей, ассоциированных с вероятностью получения достаточного количества CD34+ клеток или, напротив, с риском неудачи. К настоящему времени выявлено большое число предикторов, обладающих той или иной степенью прогностического потенциала. Разнообразие факторов и различие их прогностической важности, представленное в литературных источниках, вполне закономерно, если принять во внимание различие по числу больных в исследованиях, их гетерогенный состав по возрасту, статусу болезни, характеру и интенсивности предшествующего лечения, а также использованию разных РМ и методов статистической обработки данных. Вместе с тем, следует обратить внимание на наиболее часто выявляемый показатель, который независимо от вида РМ достоверно коррелирует с клеточностью аутотрансплантата. Это – количество CD34+ клеток, циркулирующих в ПК непосредственно перед проведением лейкоцитафереза [36,37,40–43]. В то же время, показатель оптимального уровня варьирует в достаточно широком диапазоне: от 10 до ≥ 30 клеток/мкл.

А. Olivieri с соавторами [43], используя метод анализа иерархий, предложили критерии для определения двух видов неудачных мобилизаций, одни из которых доказанные (proven), а другие – прогнозируемые (predicted). Для констатации доказанной неудачи достаточно наличие одного из двух критериев. Первый – количество CD34+ клеток меньше 20 в 1 мкл крови на 4–6 дни от начала мобилизации с применением Г-КСФ в монорежи-

ме (доза ≥ 10 мкг/кг) или до 20 дня в случае использования цитостатиков в комбинации с Г-КСФ (доза ≥ 5 мкг/кг). Второй критерий – заготовка менее 2×10^6 CD34+ клеток/кг при проведении не менее 3 сеансов афереза. Прогнозирование возможной неудачи требует соответствия одному из трех больших или двум из пяти малых критериев. Большие критерии – неудача предшествующей мобилизации, лучевая терапия на основные места локализации КМ или включение в схемы терапии препаратов, оказывающих повреждающее воздействие на КМ. Малые критерии – активная стадия болезни с проведением не менее 2 курсов цитостатической терапии, рефрактерные формы заболевания, значительная инфильтрация КМ лейкозными клетками, клеточность КМ $\leq 30\%$, возраст старше 65 лет.

Существуют разные способы, направленные на заготовку аутооттрансплантата с достаточным содержанием CD34-позитивных клеток. Один из них, проведение лейкоцитафереза по принципу “target value – tailored” (TVT), подразумевает определение объема крови, который необходимо обработать для получения желаемого количества клеток. Для этого используют показатели веса тела больного и/или количество CD34+ клеток, циркулирующих в ПК [44,45]. Так согласно A. Anguita-Comragnon с соавторами [44] для заготовки трансплантата с содержанием $\geq 2 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг достаточно обработать один объем циркулирующей крови, если в преаферезный период в 1 мкл крови циркулирует ≥ 100 CD34+ клеток. При этих же условиях для заготовки трансплантата с содержанием $\geq 5 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг необходимо обработать уже 2 объема циркулирующей крови. В 2016 году D. Sheppard с соавторами [46] опубликовали в журнале *Biology of Blood and Marrow Transplantation* статью, в которой по результатам анализа 1252 заготовок, подтвердили жизнеспособность одной из таких моделей [45], независимо от центра, где она применяется, вида заготавливаемого трансплантата (аутологичный или аллогенный) и используемого РМ. Одним из позитивных моментов метода TVT, по мнению авторов, является возможность своевременно скорректировать стратегию мобилизации, особенно если для получения запланированного количества клеток потребуются обработка 25 литров крови. Это – принципиальный момент, так как обработка уже 20 литров крови сопровождается значимым увеличением частоты нежелательных событий, включая глубокую тромбоцитопению, электролитные расстройства, коагулопатию [47,48].

Однако манипулирование только числом CD34+ клеток, циркулирующих в крови, не всегда сопряжено с реальным объемом заготавливаемых клеток. Так P. Musto с соавт. [49], обнаружив-

шие в многофакторном анализе прогностическую значимость возраста больного ($p=0,0001$) и токсичности индукционной терапии ($p=0,0001$), подтвердили их значимость как негативных предикторов даже в том случае, когда количество CD34+ клеток в 1 мкл крови было ≥ 20 . То есть, эффективная мобилизация ГСК из КМ в ПК не обязательно сопровождается удачной заготовкой аутооттрансплантата [49-51]. Данный феномен объясняется возможным изменением активности процесса мобилизации во времени и/или изменением технологии афереза, включая преждевременное прекращение процедуры из-за осложнений или медленный кровоток в системе [52].

Другой способ предупреждения неудачной заготовки – модификация РМ путем повышения дозы Г-КСФ или усиления цитотоксической составляющей режима [53-55].

S. Tuchman с соавторами [55] установили, что назначение больным ММ циклофосфана в дозе 3–4 г/м² с последующим ежедневным подкожным введением Г-КСФ по 10 мкг/кг обеспечивает заготовку аутооттрансплантата, содержащего значительно большее количество CD34+ клеток по сравнению с РМ, предполагающего введение Г-КСФ в монорежиме: 12,0 и $5,8 \times 10^6$ /кг; $p < 0,01$. Тем не менее, при последующем выполнении АутоТГСК укорочения периода постцитостатической цитопении не наблюдалось, но значительно увеличилась частота токсических осложнений во время мобилизации, что потребовало госпитализации 14% больных. Несомненный приоритет высокодозного ЦФ, а именно преодоление негативного влияния леналидомида на клеточность трансплантата и снижение числа неудачных заготовок [56], еще не означает, что объем CD34+ клеток, полученных с применением других РМ, будет ниже субоптимального даже после предшествующего приема леналидомида [57-59]. Так, согласно собственным исследованиям, медиана числа заготовленных клеток была значимо ниже после низкоинтенсивного РМ с внутривенным введением винорелбина в дозе 35 мг/м² нежели после ЦФ в дозе 3,0 г/м², но достаточной для успешного выполнения АутоТГСК больным ММ: 4,82 и $8,1 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг соответственно; $p=0,0001$ [58].

Плериксафор в мобилизации ГСК

Плериксафор представляет собой производное бициклима и является селективным обратимым антагонистом CXCR4 хемокинового рецептора. Плериксафор блокирует связывание CXCR4 с его лигандом SDF-1 α , фактором стромальных клеток-1 α , также известным как CXCL12. Считается, что индуцированный плериксафором лейкоцитоз и увеличение количества циркулирующих гемопоэтических прогениторных клеток является результатом нарушения связи между CXCR4 и его лигандом, которое приводит к по-

явлению в кровеносном русле не только зрелых, но и полипотентных клеток. Назначение плериксафора в настоящее время рассматривается как один из наиболее перспективных способов повышения эффективности мобилизации ГСК из КМ в ПК. Привлекательность данного метода обусловлена, в частности, тем что, например, сочетание Г-КСФ с плериксафором предоставляет возможность полностью отказаться от химиопрепаратов. Тем самым, значимо снижается цитостатическая нагрузка на кроветворные клетки и клетки гемопозитической ниши с уменьшением риска их дополнительного повреждения и, как следствие, уменьшается риск последующего развития вторичных неоплазий. Не менее важным является и тот факт, что, несмотря на особенности механизма действия плериксафора, а именно подавление взаимодействия стволовых клеток со стромальным микроокружением, его назначение не приводит к увеличению числа плазматических клеток, циркулирующих в ПК [60]. Немаловажным с практической точки зрения является и возможность сокращения интервала от завершения заготовки трансплантата до начала режима кондиционирования.

Плериксафор может быть составляющим компонентом РМ исходно или назначаться при низком количестве CD34+ клеток, циркулирующих в ПК в преаферезном периоде, т. е. применяться по необходимости (on demand) [51,61].

В большинстве публикаций, описывающих результаты заготовки трансплантата с применением Г-КСФ и плериксафора, приводится стандартная схема мобилизации. Утром в течение 4-х дней назначается инъекция Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг. Вечером 4-го дня за 10–11 часов до начала первого сеанса лейкоцитафереза подкожно вводится плериксафор в дозе 0,24 мг/кг. На 5-й день через 1 час после инъекции Г-КСФ инициируют процедуру цитафереза. Последующие введения Г-КСФ и плериксафора, а также сеансы цитафереза проводят до 3–5 дней или до получения запланированного объема CD34+ клеток. Данный режим, например, по данным проспективного исследования PREDICT, обеспечивает заготовку $\geq 2 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг у 98% больных и $\geq 6 \times 10^6$ /кг у 89% больных. При этом первое введение плериксафора сопровождалось увеличением числа циркулирующих в крови CD34+ клеток в 2,6 (0,2–94,0) раза. Наиболее частыми осложнениями во время мобилизации были диарея (7%), тошнота (6%) и оссалгии (4%). Восстановление нейтрофилов и тромбоцитов после АутоТГСК было зафиксировано у 95% и 98% больных с медианой длительности периода приживания 14 и 18 дней соответственно [62].

Временные особенности введения плериксафора, т. е. назначение в ночные часы, обусловлены

его фармакокинетикой, а именно тем, что максимальная мобилизационная активность наблюдается через 10 часов после инъекции [63]. Вместе с тем опубликованы результаты нескольких исследований, в которых интервал от назначения препарата до начала сеанса цитафереза был увеличен, т. е. имело место ранее (послеобеденное) введение плериксафора. Причина – отсутствие возможности выполнения инъекции в вечернее время в тех случаях, когда подготовка больного к заготовке аутотрансплантата осуществляется в амбулаторных условиях, что многими авторами рассматривается как возможность значимого сокращения материальных затрат на лечение. По результатам отдельных исследований увеличение интервала от 14 до 18 часов не приводило к снижению характеристик трансплантата более чем у 90% больных [64–66]. Напротив, по данным J. Stover с соавторами [67] в случае раннего назначения плериксафора число удачных заготовок было значимо больше, чем при стандартных сроках введения (94% и 81,6% соответственно; $p=0,0111$) и это при том, что медиана сеансов цитафереза была значимо меньше: 1 и 2 дня соответственно; $p=0,0156$. R. Harvey с соавт. [65], решив заготовить у больных ММ трансплантат с содержанием $\geq 10 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг за один сеанс лейкоцитафереза, увеличили дозу вводимого Г-КСФ: плериксафор вводили в 15:00,

а Г-КСФ назначали по 7,5 мкг/кг дважды в день. Объем обрабатываемой крови при проведении цитафереза был в диапазоне от 20 до 24 литров. За один сеанс запланированное количество клеток было получено у 70% больных и у 90% было заготовлено $\geq 6 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг. Несмотря на практическое решение поставленной цели, возможная связь полученных результатов с увеличенной дозой Г-КСФ авторами статьи не обсуждалась.

Учитывая стоимость плериксафора [68], оптимальным условием его использования в комбинации с Г-КСФ представляется возможность заготовки $\geq 2,0 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг за одну процедуру лейкоцитафереза. В связи с этим, безусловно, необходимо владеть информацией о клинико-гематологических показателях, ассоциированных с неудачными заготовками и, в первую очередь, о возможном негативном влиянии леналидомида на мобилизационный потенциал плериксафора [67,69,70]. L. Costa с соавт. [69] было установлено, что при введении Г-КСФ в монорежиме потребность в дополнительном назначении плериксафора была значимо выше у больных ММ, предварительно получивших более 4 курсов леналидомида по сравнению с 1–4 курсами или не получавших леналидомид: 84%, 63% и 45% соответственно; $p=0,01$. В свою очередь I. Micaleff с соавторами [70] обнаружили значение

предшествующего приема леналидомида только для случаев ремобилизации (т. е. повторной заготовки трансплантата): субоптимальный объем CD34+ клеток был заготовлен у 100% больных, получивших менее 3 курсов, и у 72% больных с >6 курсами леналидомида в анамнезе. В то же время J. Stover с соавторами [67], применявших для мобилизации комбинацию Г-КСФ с плериксафором, не выявили влияния на клеточность заготовленного трансплантата таких показателей как возраст, лучевая терапия, предшествующее назначение мелфалана, флударабина или леналидомида, тромбоцитопения ниже $150 \times 10^9/\text{л}$. Однако из-за небольшого числа наблюдений авторы не оценивали значение числа курсов леналидомида.

В силу высокой стоимости плериксафора, следует признать, что наиболее приемлемым представляется вариант с однократным введением препарата. По данным G. Gurta с соавторами [71] данное условие выполнимо у 95% больных, целью мобилизации у которых была заготовка не менее 3×10^6 CD34+ клеток/кг, при условии циркуляции в крови CD34+ клеток на уровне $\geq 30/\text{мкл}$. Напротив, в случае меньшего числа циркулирующих в крови CD34+ клеток, 95% больным потребовалось дополнительное назначение плериксафора. При повторном введении плериксафора конечная цель была зафиксирована только у 44,4% больных. По мнению авторов число CD34+ клеток в крови менее 30/мкл в день проведения первого сеанса афереза – основание для планирования второй инъекции плериксафора при заготовке аутооттрансплантата с субоптимальной клеточностью.

Наряду с определением показаний к введению или, напротив, исключения плериксафора из состава РМ некоторыми авторами предлагается использовать количество циркулирующих в крови CD34+ клеток для определения дозы однократно вводимого плериксафора. Так de Leon A.G. с соавторами [72], применяя в качестве пограничного показателя содержание CD34+ клеток на уровне 10/мкл на 4-й день РМ, назначали плериксафор в полной дозе (0,24 мг/кг) при количестве CD34+ клеток $\leq 5/\text{мкл}$, в редуцированной дозе (0,12 мг/кг) при количестве 5-10/мкл и не назначали при количестве $\geq 10/\text{мкл}$. Трансплантат с содержанием $\geq 2 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг был заготовлен у 94,7% больных при введении только Г-КСФ, 83,3% больных при назначении редуцированной дозы плериксафора и 75% больных с полной дозой плериксафора. Снижение процента больных с заданным содержанием клеток в трансплантате по мере увеличения дозы вводимого плериксафора свидетельствует о наличии дополнительных негативных факторов, которые также необходимо учитывать при выборе интенсивности РМ. Вместе с тем важно подчеркнуть, что многими

авторами включение плериксафора в состав РМ без введения цитостатиков рассматривается как принципиальное условие не только для увеличения числа заготавливаемых CD34+ клеток, но и одновременное снижение числа сеансов лейкоцитафереза [73].

Одновременно следует признать отсутствие алгоритма, позволяющего не столько определять показания к подключению плериксафора к уже проводимому РМ (on demand) [40], сколько изначально выбирать РМ, ориентированного, в частности, на комбинацию Г-КСФ с плериксафором с высокой вероятностью заготовки полноценного трансплантата.

Собственные данные: Циклофосфан, винорелбин и плериксафор в заготовке ГСК.

Согласно заключению S. Giralt с соавторами [37], каждый трансплантационный центр должен разрабатывать и внедрять в клиническую практику собственный алгоритм мобилизации ГСК. Так данные, полученные в РЦ ТКМ ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, позволяют в настоящее время дифференцированно выбирать один из двух РМ. Промежуточные дозы ЦФ ($3 \text{ г}/\text{м}^2$) с последующим введением Г-КСФ применяются преимущественно у молодых больных ММ с указанием в анамнезе на длительный прием леналидомида, которым планируется двойная АутоТГСК. У пожилых больных ММ, которым запланировано выполнение одиночной АутоТГСК, в основном используется комбинация винорелбина с Г-КСФ. Несмотря на возможность выбора, следует отметить длительные сроки госпитализации в диапазоне от 8 до 14 дней при использовании указанных РМ. Включение высокодозного ЦФ, несмотря на его выраженный мобилизационный потенциал [74], рассматривается как нежелательная опция по причине выраженного токсического действия.

При сравнительном исследовании эффективности двух РМ, обязательным компонентом, одного из которых был высокодозный ЦФ, а другой предполагал введение Г-КСФ в монорежиме, было установлено, что, независимо от вида онкогематологического заболевания, приоритет в получении большего числа клеток имела комбинация цитостатического препарата с ростовым фактором. Отсутствие ЦФ в составе РМ или введение его в дозе менее $3 \text{ г}/\text{м}^2$ наряду с возрастом больного и неходжкинской лимфомой ассоциировалось с большей вероятностью неудачи при заготовке аутооттрансплантата: $p < 0,0001$; $p = 0,047$; $p = 0,033$ и $p = 0,027$ соответственно [75].

В последующем поэтапно была проанализирована мобилизационная активность винорелбина в комбинации с Г-КСФ. Первые результаты применения данного РМ были собраны у 18 больных, из которых у 15 была ММ, у 2 – лимфома Ходжкина и у 1 больного мантийноклеточная лимфома. Ме-

диана возраста составила 56 (35–64) лет. У 50% больных ММ в состав курсов предтрансплантационной терапии входил леналидомид.

Переносимость РМ была удовлетворительной: ни в одном случае не было зафиксировано осложнений 3–4 степени тяжести. Сеансы лейкоцитафереза были инициированы преимущественно на 7–8 сутки после введения винорелбина: у 16 (89%) больных. Количество CD34+ клеток в 1 мкл крови в первый день заготовки варьировало от 26 до 431, медиана 113,5/мкл.

У 12 (70,6%) больных был проведен один сеанс лейкоцитафереза и у 6 (29,4%) было выполнено 2 сеанса. Недостаточный объем заготовленных CD34+ клеток, т.е. менее 2×10^6 /кг, как причина выполнения повторного сеанса афереза, был зафиксирован только у 3 (16,7%) больных, из которых 2 ММ и 1 лимфомой мантийной зоны. Ни один из указанных 2 больных ММ в индукционном периоде леналидомид не получал. В пересчете на вес тела количество заготовленных CD34+ клеток находилось в диапазоне от 2,06 до $8,95 \times 10^6$ /кг и медиана составила $3,68 \times 10^6$ /кг. При этом у 8 больных ММ, получавших леналидомид до введения винорелбина, было заготовлено от 2,06 до $7,78 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг, медиана $3,05 \times 10^6$ /кг.

Для сравнения РМ с введением винорелбина и ЦФ были обработаны данные 43 больных, включая 32 ММ и 11 лимфомами, в возрасте от 35 до 67 лет, медиана 57 лет. В группу, в которой для мобилизации вводился высокодозный ЦФ, вошли 15 больных: 9 с ММ и 6 с лимфомами. Во второй группе применяли винорелбин и ее составили 28 больных: 23 с ММ и 5 с лимфомами.

При назначении ЦФ в дозе 2–3 г/м² лейкоцитаферезы инициировали на 10–13 дни, медиана 11 день, а в случае введения винорелбина – на 6–9 дни, медиана 8 день; различие в сроках было значимым: $p < 0,0001$. Перед началом первого сеанса афереза медиана числа циркулирующих в крови CD34+ клеток была 197/мкл (11–715) и 94/мкл (7–431) соответственно; различие имело погра-

ничное значение: $p = 0,047$. Необходимость проведения второго сеанса лейкоцитафереза была у 3 (20%) и 7 (25%) больных соответственно. Было заготовлено $5,51 \times 10^6$ /кг и $3,67 \times 10^6$ /кг CD34+ клеток соответственно. Неудачная заготовка была констатирована у 3 больных из числа тех, кому назначался винорелбин. В качестве возможных причин неудачи рассматривались длительная терапия леналидомидом и лучевая терапия. Повышение температуры тела до 38,0–38,40С было зафиксировано у 3 (20%) больных получавших ЦФ. У одного больного из группы винорелбина имел место дискомфорт в животе, купированного без наркотических анальгетиков. Течение посттрансплантационного периода у больных с разными РМ, использованных для заготовки аутотрансплантата, не различалось [57].

Изучение мобилизационного потенциала комбинации Г-КСФ и плериксафора инициировано в 2020 году и выполнено у 4 больных ММ после подписания ими информированного согласия.

Возраст больных, включая одного мужчину и трех женщин, был в диапазоне от 48 до 66 лет. На начало мобилизации очень хороший частичный ответ (ОХЧО) и частичный ответ (ЧО) были констатированы у 2 и 2 больных соответственно. Все больные в предшествующий заготовке ГСК период получали курсы лечения, включающие бортезомиб. Леналидомид в течение короткого промежутка времени принимала только одна больная.

Содержание лейкоцитов в ПК в день заготовки аутотрансплантата было от 18,1 до $47,9 \times 10^9$ /л. Количество циркулирующих в крови CD34+ клеток от 202 до 417/мкл. В ходе выполнения одного сеанса лейкоцитафереза было заготовлено $2,3$ – $8,94 \times 10^6$ CD34+ клеток/кг. Суммарное количество КОЕ было оценено у 3 больных и варьировало от 31 до 425. Характеристика больных и результаты заготовки аутотрансплантата представлены в таблицах 1 и 2 соответственно.

С использованием заготовленного трансплантата всем больным была выполнена АутоТГСК.

Таблица 1. Характеристика больных

Б-ой	Лет	Вариант	ISS	Терапия			Вариант ответа
				Бортезомиб	Леналидомид	Другие	
ВЕ	59	IgAk	II	да	нет	нет	ОХЧО
ГН	66	IgGλ	II	да	да	нет	ОХЧО
ДИ	52	IgGκ	II	да	нет	да	ЧО
КШ	48	IgGκ	II	да	нет	нет	ЧО

Таблица 2. Результаты заготовки аутотрансплантата

Больной	CD34+клетки, в 1 мкл крови	Заготовлено CD34+ клетки, 10 ⁶ /кг	КОЕ-ГМ
ВЕ	417	8,94·10 ⁶ /кг	425
ГН	343	6,25·10 ⁶ /кг	31
ДИ	240	2,3·10 ⁶ /кг	386
КШ	202	8,73·10 ⁶ /кг	нет роста

Одному больному была выполнена тандемная трансплантация по причине сохраняющегося ЧО и достаточного числа CD34+ клеток, заготовленных за 1 сеанс лейкоцитафереза. Таким образом,

суммарно было проведено 5 АутоТГСК. В четырех случаях в посттрансплантационном периоде назначался Г-КСФ.

Таблица 3. Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток с использованием трансплантата, заготовленного после введения Г-КСФ и плериксафора

Больной	Режим кондиционирования	Трансфузии, дозы		Дни приживления	
		эритроцитов	тромбоцитов	АЧН	Тромбоциты
ВЕ	Mel200	нет	№2	15	18
ГН	Mel200	нет	№2	10	16
ДИ	Karf+Mel	нет	№1	18	20
КШ*	Karf+Mel	№1	№2	10	14
	Mel140	нет	№3	11	16

Примечание. * – больной, которому выполнена тандемная АутоТГСК с использованием клеточной взвеси, заготовленной однократно

Примечание*: Mel200 – алкеран 200 мг/м², Mel140 - алкеран 140 мг/м², Karf+Mel -карфилзомиб+алкеран 200 мг/м²)

При выполнении 5-й трансплантации, при которой введение Г-КСФ не планировалось, ростовой фактор был назначен на третьей неделе из-за отсроченного приживления трансплантата. Все больные получили от 1 до 3 инфузий концентрата тромбоцитов и в одном случае – одну дозу донорских эритроцитов. В период агранулоцитоза кратковременное повышение температуры тела до фебрильных цифр было зарегистрировано при выполнении трех трансплантаций. Восстановление нейтрофилов и тромбоцитов до уровня, расцениваемого как приживления трансплантата, было зафиксировано на 10–18 и 12–16 дни соответственно. Длительность госпитализации от дня выполнения АутоТГСК до выписки была от 14 до 20 дней (табл.3).

Заключение.

Проблема выбора РМ оптимального для каждого отдельно взятого больного ММ остается нерешенной. Сформулированные в ряде исследований предикторы возможной неудачи нередко теряют свою информативность по причине появления новых условий, снижающих вероятность заготовки полноценного аутотрансплантата.

Частный пример – перемещение в индукционный период лекарственных препаратов, ранее входящих в состав терапии спасения (salvage therapy): леналидомид, даратумумаб. Так P. Voorhees с соавторами [76], анализируя данные клинического исследования GRIFFIN, в котором сравнивается эффективность схем D-RVd и RVd в индукционном периоде, зафиксировали большую потребность в дополнительном назначении плериксафора у больных, которым назначался даратумумаб: 69,5% против 56,3%. Это подтверждается данными D. Luan с соавторами [86], которые на 4-й день мобилизации монотерапией Г-КСФ обнаружили меньшее число циркулирующих в крови CD34+ клеток (17,2 против 35,4 /мкл; p=0,0146), а также констатировали необходимость выполнения большего числа сеансов лейкоцитафереза (2,4 против 1,6 дней; p=0,0279) у больных ММ, получавших в течение 1 месяца до начала РМ даратумумаб. В то же время по мнению авторов, которые не обнаружили значимых различий в количественном и качественном составе клеточной взвеси в случае предшествующего введения даратумумаба, неблагоприятное действие последнего

могло быть сглажено включением плериксафора в состав РМ [77].

Результаты собственных исследований [57,58,75,78,79] свидетельствуют о клинической потребности в расширении списка РМ, обладающих разной степенью интенсивности. Решение данной проблемы возможно путем дальнейшего накопления собственных данных, в частности результатов клинической апробации схем, не имеющих в своем составе химиопрепаратов. Одним из таких перспективных режимов рассматривается комбинация ростового фактора с плериксафором.

Вместе с тем для включения данного РМ в соответствующий алгоритм необходима информация о прогностических факторах, ассоциированных с возможной неудачей. Принципиальным условием для активного внедрения РМ, основанного на усилении мобилизационного потенциала Г-КСФ посредством дополнительного введения плериксафора, может быть возможность получения CD34+ клеток в объеме, необходимом для

выполнения одной АутоТГСК, после одного сеанса лейкоцитафереза. Актуальность данного направления не вызывает сомнения, так как может значимо изменить тактику проведения АутоТГСК путем выполнения этапа заготовки трансплантата в амбулаторных условиях.

Конфликты интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Источник финансирования

Исследование не имело источника финансирования

Вклад авторов

Концепция и дизайн: все авторы
Сбор и обработка данных: все авторы
Представление материалов исследования: все авторы
Анализ и интерпретация: все авторы
Подготовка рукописи: все авторы
Окончательное одобрение рукописи:

Грицаев С.В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Predicting poor peripheral blood stem cell collection in patients with multiple myeloma receiving pre-transplant induction therapy with novel agents and mobilized with cyclophosphamide plus granulocyte-colony stimulating factor: results from a Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto Multiple Myeloma Working Party study / P. Musto, V. Simeon, A. Grossi et al. // *Stem. Cell. Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6. – P. 64.
2. Proposed definition of “poor mobilizer” in lymphoma and multiple myeloma: an analytic hierarchy process by ad hoc working group Gruppo ItalianoTrapianto di Midollo Osseo / A. Olivieri, M. Marchetti, R. Lemoli et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2012. – Vol. 47. – P. 342–351.
3. To L.B., Levesque J.P., Herbert K.E. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly // *Blood.* – 2011. – Vol. 118. – P. 4530–4540.
4. Gertz MA. Current status of stem cell mobilization // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Vol. 150. – P. 647–662.
5. Impairment of filgrastim induced stem cell mobilization after prior lenalidomide in patients with multiple myeloma / U. Popat, R. Saliba, R. Thandi et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2009. – Vol. 15. – P. 718–723.
6. Effect of lenalidomide therapy on mobilization of peripheral blood stem cells in previously untreated multiple myeloma patients (letter) / A. Mazumder, J. Kaufman, R. Niesvizky et al. // *Leukemia.* – 2008. – Vol. 22. – P. 1280–1281.
7. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations / S. Giralt, L. Costa, J. Schriber et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2014. – Vol. 20. – P. 295–308.
8. Peripheral blood progenitor cell mobilization for autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation: guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation / H.K. Duong, B.N. Savani, E. Copelan et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1262–1273.
9. Outcomes and costs of autologous stem cell mobilization with chemotherapy plus G-CSF vs G-CSF alone / A.D. Sung, D.T. Grima, L.M. Bernard et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2013. – Vol. 48. – P. 1444–1449.
10. Comparison of high-dose CY and growth factor with growth factor alone for mobilization of stem cells for transplantation in patients with multiple myeloma / M.A. Gertz, S.K. Kumar, M.Q. Lacy et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2009. – Vol. 43. – P. 619–625.
11. Randomized comparison of granulocyte colony-stimulating factor versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus intensive chemotherapy for peripheral blood stem cell mobilization and autologous transplantation in multiple myeloma / M. Arora, L.J. Burns, J.N. Barker et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2004. – Vol. 10. – P. 395–404.
13. Stem cell mobilization with cyclophosphamide overcomes the suppressive effect of lenalidomide therapy on stem cell collection in multiple myeloma / T. Mark, J. Stern, J.R. Furst et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2008. – Vol. 14. – P. 795–798.
14. Growth factor and patient-adapted use of plerixafor is superior to CY and growth factor for autologous hematopoietic stem cells mobilization / L.J. Costa, A.N. Miller, E.T. Alexander et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2011. – Vol. 46. – P. 523–528.
15. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma / J. DiPersio, E.A. Stadtmauer, A. Nademanee et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113. – P. 5720–5726.
16. Плериксафор у пациентов со сниженной мобилизационной способностью аутологичных гемопоэтических стволовых клеток / М.А. Кучер, М.С. Моталкина, О.Ю. Климова и др. // *Клиническая онкогематология.* – 2016. – № 2. – С. 155–161.
17. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor / J.P. Levesque, Y. Takamatsu, S.K. Nilsson et al. // *Blood.* – 2001. – Vol. 98. – P. 1289–1297.
18. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide / J.P. Levesque, J. Hendy, Y. Takamatsu et al. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111. – P. 187–196.
19. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and upregulating CXCR4 / I. Petit, M. Szyper-Kravitz, A.

Nagler et al. // *Nat. Immunol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 687–694.

20. CD34+ cells mobilized by cyclophosphamide and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) are functionally different from CD34+ cells mobilized by G-CSF / C. Cesana, C. Carlo-Stella, E. Regazzi et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 1998. – Vol. 21. – P. 561–568.

21. Pegylated granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34+ cells with different stem and progenitor subsets and distinct functional properties in comparison with unconjugated granulocyte colony-stimulating factor / I. Bruns, U. Steidl, J.C. Fischer et al. // *Haematologica.* – 2008. – Vol. 93. – P. 347–355.

22. Kim MG, Han N, Lee EK, Kim T. Pegfilgrastim vs filgrastim in PBSC mobilization for autologous hematopoietic SCT: a systematic review and meta-analysis // *Bone Marrow Transplant.* – 2015. – Vol. 50. – P. 523–530.

23. Cyclophosphamide-based hematopoietic stem cell mobilization before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma / S.A. Tuchman, W.A. Bacon, L.W. Huang et al. // *J. Clin. Apher.* – 2015. – Vol. 30. – P. 176–182.

24. Cyclophosphamide mobilization does not improve outcome in patients receiving stem cell transplantation for multiple myeloma / D. Dingli, G.S. Nowakowski, A. Dispenzieri et al. // *Clin. Lymphoma. Myeloma.* – 2006. – Vol. 6. – P. 384–388.

25. Intermediate-dose versus low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor for peripheral blood stem cell mobilization in patients with multiple myeloma treated with novel induction therapies / M. Hamadani, S.T. Kochuparambil, S. Osman et al. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2012. – Vol. 18. – P. 1128–1135.

26. Hiwase DK, Bollard G, Hiwase S. Intermediate-dose CY and G-CSF more efficiently mobilize adequate numbers of PBSC for tandem autologous PBSC transplantation compared with low-dose CY in patients with multiple myeloma // *Cytotherapy.* – 2007. – Vol. 9. – P. 539–547.

27. Low-dose or intermediate-dose cyclophosphamide plus granulocyte colony stimulating factor for progenitor cell mobilisation in patients with multiple myeloma / E. Jantunen, M. Putkonen, T. Nousiainen et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – Vol. 31. – P. 347–351.

28. Stem cell collection in patients with multiple myeloma: impact of induction therapy and mobilization regimen / A. Nazha, R. Cook, D.T. Vogl et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2011. – Vol. 46. – P. 59–63.

29. Successful mobilization of PBSCs predicts favorable outcomes in multiple myeloma patients treated with novel agents and autologous transplantation / A. Brioli, G. Perrone, F. Patriarca et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2015. – Vol. 50. – P. 673–678.

30. Efficacy of vinorelbine plus granulocyte colony stimulation factor for CD34+ hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma / P. Samaras, S. Pfrommer, B. Seifert et al. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2015. – Vol. 21. – P. 74–80.

31. Efficient mobilization of PBSC with vinorelbine/G-CSF in patients with malignant lymphoma / M. Heizmann, A.C. O'Meara, P.R. Moosmann et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2009. – Vol. 44. – P. 75–79.

32. Vinorelbine plus intermediate dose cyclophosphamide is an effective and safe regimen for the mobilization of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma / M. Annunziata, M. Celentano, B. Pocali et al. // *Ann Hematol.* – 2006. – Vol. 85. – P. 394–399.

33. Mobilization of peripheral blood progenitor cells with vinorelbine and granulocyte colony-stimulating factor in multiple myeloma patients is reliable and cost effective / M.J. Bargetzi, J. Passweg, E. Baertschi et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – Vol. 31. – P. 99–103.

34. Role of plerixafor in autologous stem cell mobilization with vinorelbine chemotherapy and granulocyte-colony stimulating factor in patients with myeloma: a phase II study (PAV-trial) / A. Schmid, D. Friess, B.M. Taleghani et al. // *Leuk. Lymphoma.* – 2015. – Vol. 56. – P. 608–614.

35. Грицаев С.В., Кузьева А.А., Бессмельцев С.С. Отдельные аспекты трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток больным множественной миеломой // *Клиническая онкогематология.* – 2017. – № 1. – С.7–12.

36. Gertz M.A. Current status of stem cell mobilization // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Vol. 150. – P. 647–662.

37. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations / S. Giralt, L. Costa, J. Schriber et al. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2014. – Vol. 20. – P. 295–308.

38. Mobilisation of tumour cells along with CD34+ cells to peripheral blood in multiple myeloma / L.M. Knudsen, T. Rasmussen, K. Nikolaisen et al. // *Eur. J. Haematol.* – 2001. – Vol. 67. – P.289–295.

39. Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation / U. Narayanasami, R. Kanteti, J. Morelli et al. // *Blood.* – 2001. – Vol. 98. – P. 2059–2064.

40. Effectiveness of an algorithm-based approach to the utilization of plerixafor in patients undergoing chemotherapy-based stem cell mobilization / E. Chow, K.V. Rao, W.A. Wood et al. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2014. – Vol. 20. – P. 10⁶⁴–10⁶⁸.

41. Quantification of peripheral blood CD34+ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: a single center experience / N.E. Lemos, M.G. Farias, F. Kubaski et al. // *Hematol. Transfus. Cell. Ther.* – 2018. – Vol. 40. – P. 213–218.

42. Cyclophosphamide plus granulocyte-colony stimulating factor for hematopoietic stem cell mobilization in patients with multiple myeloma / T.L. Lin, P.N. Wang, M.C. Kuo et al. // *J. Clin. Apher.* – 2016. – Vol. 31. – P. 423–428.

43. Proposed definition of 'poor mobilizer' in lymphoma and multiple myeloma: an analytic hierarchy process by ad hoc working group Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo / A. Olivieri, M. Marchetti, R. Lemoli et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2012. – Vol. 47. – P. 342–351.

44. Mobilization and collection of peripheral blood stem cells: guidelines for blood volume to process, based on CD34-positive blood cell count in adults and children / A.T. Anguita-Compagnon, M.T. Dibarrart, J. Palma et al. // *Transplantat. Proc.* – 2010. – Vol. 42. – P. 339–344.

45. Target value tailored (TVT) apheresis approach for blood progenitor cell collection after high-dose chemotherapy and rh-G-CSF / M.Mitterer, J. Hirber, I. Gentilini et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 1996. – Vol. 18. – P. 611–617.

46. Improved prediction of CD34+ cell yield before peripheral blood hematopoietic progenitor cell collection using a modified target value-tailored approach / D. Sheppard, J. Tay, D. Palmer et al. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2016. – Vol. 22. – P. 759–775.

47. Large-volume leukapheresis yields more viable CD34 + cells and colony-forming units than normal-volume leukapheresis, especially in patients who mobilize low numbers of CD34 + cells / J.F. Abrahamsen, S. Stammenfet, K. Liseth et al. // *Transfusion.* – 2005. – Vol. 45. – P. 248–253.

48. Collection of more hematopoietic progenitor cells with large volume leukapheresis in patients with multiple myeloma / K.R. Desikan, S. Jagannath, D. Siegel et al. // *Leuk. Lymphoma.* – 1998. – Vol. 28. – P. 501–508.

49. Predicting poor peripheral blood stem cell collection in patients with multiple myeloma receiving pre-transplant induction therapy with novel agents and mobilized with cyclophosphamide plus granulocyte-colony stimulating factor: results from a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Multiple Myeloma Working Party study / P. Musto, V. Simeon, A. Grossi et al. // *Stem. Cell. Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6. – P. 64.

50. Clinical impact and resource utilization after stem cell mobilization failure in patients with multiple myeloma and lymphoma / M.A. Gertz, R.C. Wolf, I.N. Micallef et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2010. – Vol. 45. – P. 1396–1403.

51. Plerixafor on-demand combined with chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor: significant improvement in peripheral blood stem cells mobilization and harvest with no increase in costs / G. Milone, M. Martino, A. Spadaro et al. // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Vol. 164. – P. 113–123.
52. Analysis of CD34+ cell collection using two mobilization regimens for newly diagnosed multiple myeloma patients reveals the separate impact of mobilization and collection variables / A. Abuabdou, E.R. Rosenbaum, S.Z. Usmani et al. // *J. Clin. Apher.* – 2014. – Vol. 29. – P. 251–255.
53. Mobilization of peripheral blood stem cells with chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF): a randomized evaluation of different doses of rhG-CSF / T. Demirer, M. Ayli, M. Ozcan et al. // *Br. J. Haematol.* – 2002. – Vol. 116. – P. 468–474.
54. The effect of gradual increment in rhG-CSF dose on stem cell yields in patients with multiple myeloma mobilized with intermediate dose cyclophosphamide plus rhG-CSF / S. Hacıoglu, I. Sar, M.H. Dogu et al. // *Transfus. Apher. Sci.* – 2014. – Vol. 50. – P. 71–74.
55. Cyclophosphamide-based hematopoietic stem cell mobilization before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma / S.A. Tuchman, W.A. Bacon, L.W. Huang et al. // *J. Clin. Apher.* – 2015. – Vol. 30. – P. 176–182.
56. Stem cell mobilization with cyclophosphamide overcomes the suppressive effect of lenalidomide therapy on stem cell collection in multiple myeloma / T. Mark, J. Stern, J.R. Furst et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2008. – Vol. 14. – P. 795–798.
57. Заготовка гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой: влияние леналидомида в индукционной терапии и режима мобилизации / И.И. Кострома, А.А. Жернякова, Ж.В. Чубукина и др. // *Клиническая онкогематология.* – 2018. – №2. – С. 192–197.
58. Факторы, ассоциированные с эффективной заготовкой и приживлением аутотрансплантата у больных множественной миеломой / И.И. Кострома, А.А. Жернякова, Ж.В. Чубукина и др. // *Клиническая онкогематология.* – 2019. – №1. – С. 32–36.
59. Evaluating the effects of lenalidomide induction therapy on peripheral stem cells collection in patients undergoing autologous stem cell transplant for multiple myeloma / D. Bhutani, J. Zonder, J. Valent et al. // *Support. Care. Cancer.* – 2013. – Vol. 21. – P. 2437–2442.
60. Mobilization of peripheral blood stem cells for autologous transplant in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients by plerixafor and G-CSF and detection of tumor cell mobilization by PCR in multiple myeloma patients / S. Fruehauf, G. Ehninger, K. Hubel et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2010. – Vol. 45. – P. 269–275.
61. Hematopoietic recovery kinetics predicts for poor CD34+ cell mobilization after cyclophosphamide chemotherapy in multiple myeloma / G.H. Ozsan, I.N. Micallef, A. Dispenzieri et al. // *Am. J. Hematol.* – 2012. – Vol. 87. – P. 1–4.
62. Plerixafor and granulocyte colony-stimulating factor for first-line steady-state autologous peripheral blood stem cell mobilization in lymphoma and multiple myeloma: results of the prospective trial PREDICT / N. Russell, K. Douglas, A.D. Ho et al. // *Haematologica.* – 2013. – Vol. 98. – P. 172–178.
63. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of plerixafor in patients with non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma / D.A. Stewart, C. Smith, R. MacFarland et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2009. – Vol. 15. – P. 39–46.
64. Late afternoon dosing of plerixafor for stem cell mobilization: a practical solution / D.L. Cooper, K. Pratt, J. Baker et al. // *Clin. Lymphoma. Myeloma.* – 2011. – Vol. 11. – P. 267–272.
65. Temporal changes in plerixafor administration and hematopoietic stem cell mobilization efficacy: results of a prospective clinical trial in multiple myeloma / R.D. Harvey, J.L. Kaufman, H.R. Johnson et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2013. – Vol. 19. – P. 1393–1411.
66. Shi P.A., Miller L.K., Isola L.M. Prospective study of mobilization kinetics up to 18 hours after late afternoon dosing of plerixafor // *Transfusion.* – 2014. – Vol. 54. – P. 1263–1268.
67. Evaluation of hematopoietic stem cell mobilization rates with early plerixafor administration for adult stem cell transplantation / J. Stover, J.R. Shaw, M. Kuchibhatla et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* – 2017. – Vol. 23. – P. 1290–1294.
68. Comparable efficacy and lower cost of PBSC mobilization with intermediate-dose cyclophosphamide and G-CSF compared with plerixafor and G-CSF in patients with multiple myeloma treated with novel therapies / F. Awan, S.T. Kochuparambil, A. Falconer et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2013. – Vol. 48. – P. 1279–1284.
69. Growth factor plus preemptive ('just-in-time') plerixafor successfully mobilizes hematopoietic stem cells in multiple myeloma patients despite prior lenalidomide exposure / L.J. Costa, J. Abbas, K.R. Hogan et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2012. – Vol. 47. – P. 1403–1408.
70. Plerixafor (Mozobil) for stem cell mobilization in patients with multiple myeloma previously treated with lenalidomide / I.N. Micallef, A.D. Ho, L.M. Klein et al. // *Bone. Marrow. Transplant.* – 2011. – Vol. 46. – P. 350–355.
71. Optimization of plerixafor utilization based on peripheral blood CD34+ count for autologous peripheral blood stem-cell collection / G.K. Gupta, S. Perreault, S. Seropian et al. // *Blood.* – 2020. – Vol. 136. – Suppl. 1. – P. 41.
72. Incorporating reduced-dose plerixafor to a preemptive mobilization algorithm increases access to autologous transplantation in a limited-resource setting / A.G. de Leon, Navarro, C.O. Cantu et al. // *Blood.* – 2019. – Vol. 134. – Suppl. 1. – P. 4476.
73. A retrospective record review of mobilization strategies with and without plerixafor for autologous stem cell transplant in patients with multiple myeloma / T.M. Mark, J.S. Bubalo, G. Milkovich et al. // *Blood.* – 2019. – Vol. 134. – Suppl. 1. – P. 5634.
74. Are We choosing mobilization regimens for autologous stem cell transplantation in multiple myeloma wisely? A single center comparison of GCSF+/-plerixafor vs cyclophosphamide/GCSF+/- plerixafor / Yang, M. Dehghani, W. Hopman et al. // *Blood.* – 2019. – Vol. 134. – Suppl. 1. – P. 2136.
75. Заготовка трансплантата для аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток онкогематологическим больным: частота и причины // С.В. Грицаев, А.А. Кузьева, С.В. Волошин и др. // *Российский медицинский журнал.* – 2013. – № 1. – С. 30–35.
76. Daratumumab, lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone for transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma: the GRIFFIN trial / P.M. Voorhees, J.L. Kaufman, J. Laubach et al. // *Blood.* – 2020. – Vol. 136. – P. 936–945.
77. Impact of daratumumab on stem cell collection, graft composition and engraftment among multiple myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant / S. Manjappa, R. Fox, J. Reese et al. // *Blood.* – 2020. – Vol. 136. – Suppl. 1. – P. 35–37.
78. Первый опыт мобилизации гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь винорелбином у больных лимфопролиферативными заболеваниями / С.В. Грицаев, А.А. Кузьева, И.И. Кострома и др. // *Medline.ru.* – 2017. – Том. 18. – С. 409–424.
79. Колониеобразующая способность гемопоэтических стволовых клеток и количество CD34+ клеток в продукте лейкоцитафереза при различных режимах мобилизации у больных множественной миеломой / В.А. Балашова, Ж.В. Чубукина, И.И. Кострома и др.

Кузнецов Ю.Н., Голубовская И.К., Кулагин А.Д.

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

ТЕЛОМЕРОПАТИИ КАК МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНАЯ ПРОБЛЕМА

Обзор литературы

Резюме

Теломеропатии – это фенотипически гетерогенная группа заболеваний, характеризующихся дефектами теломер в результате герминальных мутаций в ключевых генах, ответственных за поддержание их длины. Основными проявлениями теломеропатий (ТП) являются костномозговая недостаточность, иммунодефицит, прогрессирующая дисфункция различных органов и высокий риск развития онкологических заболеваний. Появление новых методов исследования, таких как секвенирование нового поколения, позволило существенно увеличить частоту верификации дан-

ных заболеваний. Терапевтическая тактика при ТП отличается от стандартных протоколов при клинически схожих заболеваниях. Возможности лечения ТП ограничены, однако своевременная постановка диагноза позволяет отказаться от неэффективных методов лечения и проявить бдительность в рамках данной патологии к другим членам семьи.

Ключевые слова: Теломеры, врожденный дискератоз, костномозговая недостаточность, опухоли, иммунодефицит, болезни легких, болезни печени

Kuznetsov Yu.N., Golubovskaya I.K., Kulagin A.D.

R.M. Gorbacheva Research Institute, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

TELOMEROPATHIES AS A MULTIDISCIPLINARY PROBLEM

Abstract

Telomeropathies are a phenotypically heterogeneous group of diseases characterized by defects in telomeres resulting from germline mutations in key genes responsible for maintaining telomere length. The main manifestations of telomeropathy are bone marrow failure, immunodeficiency, progressive dysfunction of various organs and a high risk of cancer. New specific research methods, such as next-generation sequencing, significantly increased

the frequency of verification of these diseases. The treatment approaches for these patients differ from standard protocols for clinically similar diseases. Therapeutic options for telomeropathies are very limited, but early diagnosis allows to refuse ineffective treatment methods and show an alertness for these diseases in relatives of patients.

Key words: Telomeres, congenital dyskeratosis, bone marrow failure, tumors, immunodeficiency, lung disease, liver disease

Введение

Теломеропатии (ТП) или болезни теломер - это фенотипически гетерогенная группа заболеваний, вызываемая герминальными мутациями генов, вовлеченных в поддержание длины теломер, ДНК-белковых структур, служащих для защиты концов хромосом от деградации и слияния, обеспечивая стабильность генома [1].

ДНК теломер человека состоит из тысяч повторов TTAGGG, образующих комплекс с белками шелтерина (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, POT1, TPP1), что предотвращает распознавание свободных концов ДНК как двухцепочечных разрывов. Концы линейной ДНК не могут реплицироваться обычной ДНК-полимеразой, поэтому длина теломер уменьшается с каждым клеточным циклом и рассматривается как маркер митотической истории соматических клеток и остаточной про-

лиферативной способности [2]. Когда теломеры становятся критически короткими, наступает остановка клеточного цикла или гибель клеток. Самообновляющиеся взрослые клетки, такие как гемопоэтические стволовые клетки, противодействуют теломер-ассоциированному старению, обеспечивая сохранение их длины в ходе повторных делений клеток при помощи фермента теломеразы [1, 2, 3, 4]. Теломераза представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс. Коро- вый фермент включает в себя теломеразную обратную транскриптазу (TERT) и теломеразную РНК (TERC), содержащую матричный участок для удлинения ДНК. Кроме того, в теломеразный комплекс входит еще целый ряд вспомогательных компонентов, которые обеспечивают функционирование теломеразы in vivo. Основным критерием эффективности работы теломеразы явля-

ется количество теломерных повторов на концах теломер, т.е. длина теломерных районов ДНК [1, 2, 3, 4].

На данный момент выявлено множество генов ответственных за поддержание длины теломер (таблица 1). Мутации в указанных генах приводят к преждевременному старению и апоптозу

вовлеченных клеток. Характерны разные типы наследования, X-сцепленный рецессивный, ауто-сомно-доминантный и ауто-сомно-рецессивный, но пенетрантность может варьировать даже в пределах одной родословной [5, 6, 7].

Таблица 1. Генетические варианты и клинические проявления врожденного дискератоза [адаптировано согласно 7]

№	Ген (продукт)	Тип наследования	Синдромы и генетические особенности	Частота при классическом ВДК	Значение
1	DKC1 (dyskerin)	X-сцепленный рецессивный	СКТ, СХХ, ФЛ, АА	Часто	Снижение активности TERC и теломеразы
2	TERC (TERC)	АД	СКТ, АА, ФЛ, ФП, ВО	Редко	Снижение активности теломеразы
3	TERT (TERT)	АД	СКТ, СХХ, АА, ФЛ, ФП, ВО	Редко	Снижение активности теломеразы или нарушение рекрутирования теломер
		АР	СКТ, СХХ	Редко	
4	NOP10 (NOP10)	АР	СКТ	Очень редко	Снижение активности TERC и теломеразы
5	NHP2 (NHP2)	АР	СКТ	Очень редко	Снижение активности TERC и теломеразы
6	TINF2 (TIN2)	АД	СКТ, СХХ, СР, ФП	Часто	Неизвестно
7	WRAP53 (TCAB1)	АР	СКТ	Очень редко	Нарушение доставки теломер к тельцам Кахала
8	CTC1 (CTC1)	АР	СКТ, ЦМ	Редко	Нарушение репликации теломер; ломкость теломер
9	RTEL1 (RTEL1)	АД АР	ФЛ, АА. СКТ, СХХ, АА, ФЛ	Н/А Редко	Нарушение репликации теломер; ломкость теломер
10	ACD (TPP1)	АД АР	АА СКТ, СХХ	Н/А Очень редко	Нарушение рекрутирования теломер теломеразой
11	PARN (PARN)	АД АР	ФЛ, АА СКТ, СХХ, АА, ФЛ, ФП	Н/А Редко	Снижение активности TERC и теломеразы
12	NAF1 (NAF1)	АД	СКТ, АА, ФЛ, ФП, ВО;	Очень редко	Снижение активности TERC и теломеразы
13	STN1 (STN1)	АР	СКТ, ЦМ	Очень редко	Нарушение репликации теломер; ломкость теломер

Примечание: АД - ауто-сомно-доминантный тип наследования; АР - ауто-сомно-рецессивный тип наследования; ВДК - врожденный дискератоз; СКТ - слизисто-кожная триада (лейкоплакия, гиперпигментация, дистрофия ногтевых пластин); ФЛ - фиброз легких; ФП - фиброз печени; АА - апластическая анемия; СХХ - синдром Хойерала-Хрейдарссона; ВО - риск развития вторичных опухолей и МДС/ОМЛ; ЦМ - Цереброретинальная микроангиопатия с кальцификациями и кистами; СР - синдром Ревеса. Оценка частоты: «часто» - более 10% у пациентов с классическим ВДК, «редко»-менее 10 % у пациентов с классической ВДК, «очень редко» - единичные случаи.

Характерными клиническими проявлениями ТП являются костномозговая недостаточность, поражение внутренних органов, кожно-слизистая триада, иммунодефицит, а также развитие гематологических и солидных злокачественных заболеваний. Фенотипическая гетерогенность обусловлена степенью выраженности того или иного клинического синдрома и зачастую зависит от вида мутантного гена [8, 9, 10, 11, 12, 13].

Стоит отметить, что в медицинском сообществе нет единого мнения по поводу названия данных заболеваний, используются такие термины как теломеропатии, болезни теломер, синдром укороченных теломер, а в клинической практике

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

часто весь разнообразный комплекс клинических проявлений включают в понятие врожденный дискератоз (ВДК) [14]. ВДК, особенно в варианте Хойерала-Хрейдарссона, является наиболее ярким проявлением ТП с высокой пенетрантностью и часто с врожденными клиническими проявлениями.

Однако мутации теломеразного комплекса и других генов, участвующих в поддержании теломер, могут дебютировать у взрослых без явного семейного анамнеза и классических проявлений ВДК с поражения одного органа или плоскоклеточного рака. Вероятно мутации генов теломерного комплекса выступают в качестве факторов риска, а не генетической детерминированности костномозговой недостаточности, фиброза легких и печени. Широкий спектр дополнительных эпигенетических и других генетических событий и повреждающих факторов, таких как курение, алкоголь, инфекции, аутоиммунные реакции способствуют развитию болезни в конкретном фенотипе ТП.

Ключевой проблемой ТП, как и большинства других редких заболеваний, является недостаточная осведомленность врачей и гиподиагностика. До недавнего времени проблемой врожденных патологий занимались в основном педиатры, однако, в настоящее время в мировой и отечественной литературе все чаще описывают верифицированные случаи конституциональных заболеваний у взрослых пациентов.

Целью данного обзора является освещение темы теломеропатий как мультидисциплинарной проблемы.

Эпидемиология

Теломеропатии являются редкими заболеваниями, распространённость в популяции по данным международных исследований составляет около 1:1 000 000 [8, 9]. На примере ВДК, известно, что мужчины страдают этим заболеванием

чаще, чем женщины в соотношении примерно 3:1, это объясняется тем, что наиболее распространенным типом наследования является рецессивный X-сцепленный [5, 6, 7, 8]. Женщины зачастую являются бессимптомными носителями мутантных генов или имеют стертые фенотипические изменения [15]. Эпидемиология ТП в России не изучена, ввиду отсутствия регистра данных заболеваний. Учитывая большое количество пациентов имеющих стертые проявления заболевания с поздней клинической манифестацией и низкую доступность высокоточных методов исследования, таких как секвенирование нового поколения и Flow-FISH, имеющиеся в мире эпидемиологические данные во многом не отражают действительность.

В зарубежной литературе указывается, что около 5% пациентов с апластической анемией (АА) и 3% пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС) / острым лейкозом (ОЛ) имеют наследственный вариант мутаций в генах, характерных для ТП [15, 16, 17]. В одном из наиболее крупных исследований показано, что частота выявления мутаций генов, ответственных за репарацию теломер, у пациентов старше 18 лет с семейными и спорадическими гематологическими заболеваниями с или без идиопатического фиброза легких составляет около 10% (16 из 153 обследованных) [9].

Клинические проявления

Манифестация заболевания может происходить в разных возрастных группах [18]. Клинические проявления разнообразны и во многом зависят от гена, в котором произошла мутация, его пенетрантности, пола и возраста дебюта заболевания [9, 10, 19]. В таблице 2 представлены наиболее частые клинические проявления у пациентов с ВДК.

Таблица 2. Клинические проявления у пациентов с классическим ВДК [18]

Клинические проявления	Частота (%)
Гиперпигментация кожи	88-89
Дистрофия ногтевых пластин	73-88
Лейкоплакия	64-78
Костномозговая недостаточность	50
Патология глаз, повышенная слезоточивость	31-38
Фиброз легких	20
Задержка в развитии	14-25
Патология зубочелюстной системы	17-19
Алопеция или ранняя седина	16-18
Гипергидроз	10-15

Низкорослость	14
Патология ЖКТ (фиброз печени, стриктуры пищевода, язвы, мальабсорбция)	14
Вторичные опухоли	10-12
Микроцефалия	8
Патология мочевыводящей системы (стриктура уретры, фимоз)	7
Гипоплазия мозжечка, атаксия	7
Гипогонадизм, крипторхизм	1-5

Кожно-слизистая триада

Классическая кожно-слизистая триада характеризуется наличием лейкоплакии слизистой, ретикулярной гиперпигментации кожи и дистрофии ногтевых пластин (рисунок 1).

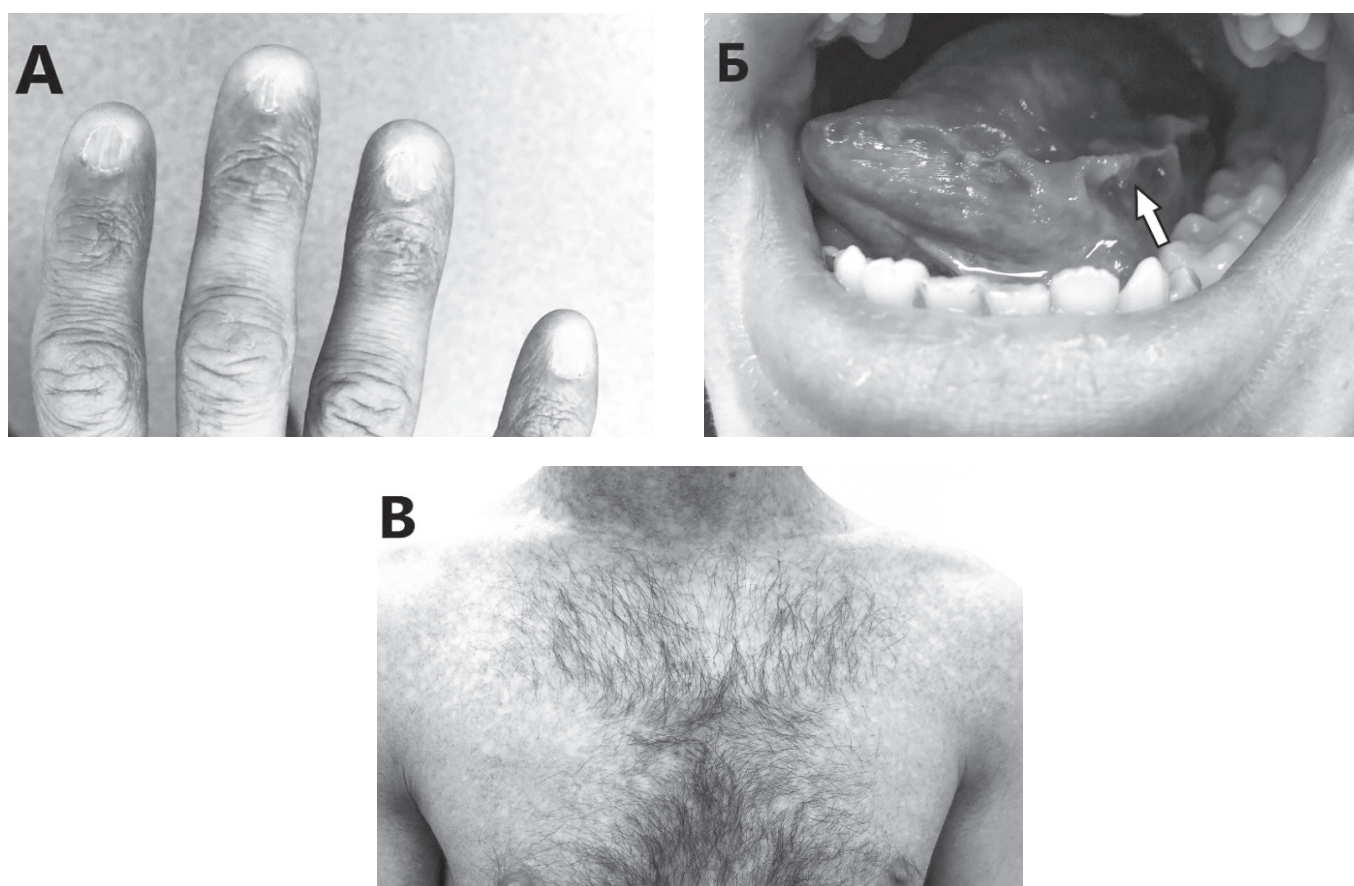


Рисунок 1. Кожно-слизистая триада при ВДК. А – продольная исчерченность ногтевых пластин. Б – лейкоплакия языка. В- диспигментация кожи (собственные наблюдения авторов).

Дистрофия ногтей проявляется повышенной ломкостью, возникает продольная исчерченность ногтевых пластин, вплоть до полного их исчезновения или образования дорсального птеригиума. Для ретикулярной гиперпигментации/диспигментации характерна локализация на лице, шее и верхней части грудной клетки, чаще проявляется как небольшие участки усиленного сетчатого рисунка кожи. Гиперпигментированную область зачастую окружают гипопигментированные

участки кожи или телеангиэктазии. Также среди кожных проявлений могут наблюдаться гипергидроз, акроцианоз, кератодермия [8, 20, 21, 22]. Лейкоплакия слизистых в большинстве случаев поражает полость рта, особенно средний отдела языка и неба, и у 30 % пациентов участки лейкоплакии трансформируются в плоскоклеточный рак [20, 23]. Из других дерматологических проявлений стоит отметить наличие ранней седины и аллопеции у пациентов, что также является мар-

кером возможной патологии теломер [22].

Костномозговая недостаточность

Костный мозг у пациентов с мутациями в генах теломер гипоклеточный или соответствует картине аплазии кроветворения. Клинически костномозговая недостаточность (КМН) у взрослых пациентов часто манифестирует как тромбоцитопения, которая нередко ошибочно трактуется как иммунная, или макроцитарная анемия, реже в виде изолированной нейтропении. Начальные изменения показателей крови могут быть минимальными или сразу выраженными, оставаться стабильными длительное время или быстро прогрессировать до полной аплазии кроветворения с панцитопенией [7, 8, 15, 16, 24]. В свою очередь примерно у 30% происходит трансформация в МДС, а у 10% в ОМЛ [25]. Клональная эволюция почти всегда сопровождается появлением новых цитогенетических аномалий, самыми частыми являются моносомия 7 хромосомы и трисомия 8 [14].

Тестирование клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) методом высокочувствительной проточной цитометрии документирует наличие популяций клеток крови с фенотипом ПНГ у половины больных с приобретенной апластической анемией [26]. Принято считать, что феномен экспансии клона ПНГ характерен для иммуноопосредованных синдромов костномозговой недостаточности, поэтому не выявляется при конституциональных вариантах и даже может быть критерием их исключения [27]. Тем не менее в некоторых исследованиях сообщалось о выявлении минорного клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии у пациентов с доказанной мутацией в гене TERT [14].

Иммунодефицит

Дети и взрослые с теломеропатиями часто имеют лимфопению, связанную с ускоренным апоптозом и нарушением созревания предшественников Т- и В-лимфоцитов [28, 29, 30]. Характерны дефициты наивных Т-клеток, ограниченный репертуар Т-клеток, в ряде случаев присутствует гипоиммуноглобулинемия.

Больные с теломеропатиями развивают инфекции, в том числе оппортунистические, даже в отсутствие тяжелой недостаточности кроветворения. В случаях нераспознанной теломеропатии иммуносупрессивная терапия по поводу ошибочно диагностированной приобретенной апластической анемии может быть крайне опасной.

Болезни легких

Идиопатический фиброз легких (ИФЛ) является классическим заболеванием в контексте ТП. В Европе распространенность данной патологии составляет 1,25–23,4 на 100 000 человек. Наряду с другими механизмами развития, в большом проценте случаев семейного ИФЛ выявляются мута-

ции в генах, ответственных за поддержание длины теломер [31, 32, 33, 34].

Данное заболевание зачастую появляется во взрослом возрасте, и имеет прогрессирующее течение [31]. В свою очередь фиброз легких в рамках ВДК является одной из основной причины смертности данных пациентов [5, 8]. Картина на высокоразрешающей компьютерной томографии (ВРКТ) имеет характерные изменения в виде «матовых стекол» и «сотового легкого» [31, 32, 33, 34]. Однако при исследовании функции легких были продемонстрированы рестриктивные и обструктивные изменения у 40% обследованных пациентов с ВДК, при том что большая часть из них не имела изменений на ВРКТ, что может быть предиктором к развитию фиброза легких [35]. Помимо легочного фиброза, сообщается о ряде других легочных проявлений ТП, включая облитерирующий бронхиолит, хронический гиперчувствительный пневмонит и эмфизему [30].

Болезни печени

Поражение печени является одним из основных проявлений ТП. Частота поражения печени варьируют от 15 до 40% в разных исследованиях, однако известно, что заболевания печени вносят большой вклад в смертность пациентов [5, 8, 12, 36].

Печеночные проявления ТП включают неалкогольный стеатогепатит, узловую регенеративную гиперплазию, криптогенный цирроз печени, нецирротическую портальную гипертензию. Предположить поражение печени можно методами визуализации, в частности эластометрией, МРТ, однако точная верификация зачастую невозможна без биопсии. При гистологическом исследовании печень неоднородна, можно увидеть воспаление, накопление железа в отсутствие трансфузионного или наследственного гемохроматоза, некроз гепатоцитов, мостовидный фиброз или узловую регенеративную гиперплазию [5, 12, 36].

Опухоли

Кумулятивная заболеваемость злокачественными новообразованиями при ВДК оценивается в 20–30% к возрасту 50 лет. Злокачественные новообразования обычно развиваются на третьем десятилетии жизни и поэтому чаще диагностируются у лиц с более легкими формами заболевания. Наиболее распространенными солидными опухолями являются плоскоклеточный рак головы и шеи, желудочно-кишечного тракта и женских половых путей [13, 25]. Из всех ТП наиболее часто вторичными негематологическими заболеваниями страдают пациенты с мутацией DKC1 [25].

Стриктуры слизистых оболочек

Значительная часть больных (до 20%) с ВДК имеют стриктуры различных слизистых оболочек

чек, включая стеноз слезных протоков, стеноз, стриктуру или перепонки пищевода, кишки и уретры [18].

Диагностика

В группу риска по ТП относятся пациенты с отягощенным семейным анамнезом гематологических и опухолевых заболеваний, наличием фенотипических аномалий и органическими поражениями, сочетающимися с недостаточностью костного мозга, включая минимальные и монолинейные цитопении, а также пациенты с ИФЛ [9, 37]. При подозрении на ТП стоит помнить о разнообразии клинических симптомов, которые зачастую выражены умеренно, поэтому обследование должно проводиться комплексно, по всем органам риска, включая желудочно-кишечный тракт, печень, легкие и костный мозг [5, 9, 10, 11, 12].

При консультировании ребенка и взрослого пациента с неясной моно-, билинейной цитопенией и панцитопенией гематологу следует тщательно оценить все возможные физикальные клинические проявления ТП, анамнез пациента (например, стриктура пищевода, болезни печени и легких, анамнез плоскоклеточного рака и др.) и семейный анамнез на наличие любых вышеперечисленных заболеваний.

Специфичными диагностическими исследованиями для ТП является определение длины теломер и секвенирования генома [1].

Существует широкий спектр методов измерения длины теломер: анализ терминальных рестрикционных фрагментов (TERF), количественная ПЦР (qPCR), STELA (Single TElomere Length Analysis) – анализ длины единичной теломеры; MMQPCR (monochrome multiplex Q-PCR), Q-FISH (Quantitative fluorescence) – определение длины теломер в метафазных хромосомах при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и количественного измерения флуоресценции; FlowFISH – определение относительной длины теломер с помощью проточной цитофлуориметрии [38, 39, 40].

Феномен укорочения теломер сам по себе не является патогномическим признаком наследственных теломеропатий и выявляется у части больных с приобретенной АА, является отражением пролиферативного стресса резидуального пула столовых кроветворных клеток и предшественников [41, 42].

В качестве молекулярно-генетических исследований одним из самых перспективных является секвенирование нового поколения (NGS) – процесс определения последовательности нуклеотидов в геномной ДНК или в совокупности информационных РНК (транскриптоме) путем амплификации множества коротких участков генов, с дальнейшим многократным их прочтением и сравнением с референсными последовательностями генов [43]. Данный метод позволяет одновременно исследовать большое количество ключевых генов, что дает возможность проводить дифференциальную диагностику с другими врожденными заболеваниями, имеющими схожую картину, особенно у пациентов с АА или МДС/ОМЛ [18].

Так же стоит отметить важность высокой онкологической настороженности у пациентов с уже выявленными ТП. Рекомендуются регулярное проведение онкоскрининга [5, 13].

Лечение

Специфического лечения для ТП не существует, радикальными методами для данной патологии остается трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и солидных органов.

В рамках единственной излечивающей опции при КМН используют аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). На данный момент показаниями к проведению алло-ТГСК являются клональная эволюция заболевания в МДС, высокая трансфузионная зависимость и высокий риск развития тяжелых инфекционных осложнений. В результате генетических дефектов поддержания генома, данные пациенты гиперчувствительны к облучению и химиотерапии, что приводит к низкой выживаемости при использовании миелоаблативных режимов кондиционирования (РК) (таблица 3) [44, 45, 46, 47]. Использование РК сниженной интенсивности ассоциировано с меньшей ранней посттрансплантационной летальностью, однако отдаленные результаты алло-ТГСК остаются неудовлетворительными, это связано с большим количеством осложнений, таких как прогрессирующий фиброз легких и печени, тяжелые формы хРТПХ, вторичные злокачественные опухоли [44, 47].

Таблица 3. Аллогенная трансплантация костного мозга при ВДК [45, 46, 47]

Исследование	N	Возраст, лет	Кондиционирование	Профилактика РТПХ	Общая выживаемость
Ayas M., 2013	9	4,9-31,1	Флударабин, Циклофосфамид, АТГ; Флударабин, низкодозовое ТОТ	Циклоспорин ММФ/ метотрексат	77% (5 лет)
Nelson, A. S., 2016	7	1,3-12,5	Алемтузумаб, Флударабин, Мелфалан	Циклоспорин ММФ	71 % (3 года)
Fiorreda F., 2018 (кооперативное исследование EBMT)	94	0-33,5	Флударабин, Циклофосфамид +/- низкодозовое ТОТ; Бусульфан, Циклофосфамид; Флударабин, Мелфалан +/-АТГ/Алемтузумаб	Циклоспорин ММФ/ метотрексат	66 % (3 года)

Трансплантация легких и печени у пациентов с ТП также ассоциируется с низкой выживаемостью в сравнении с пациентами без ТП, что обусловлено более частыми осложнениями, такими как тяжелая панцитопения, почечная недостаточность, токсичность ингибиторов кальциневрина, дисфункция трансплантата, инфекции [48, 49, 50]. Поэтому необходима тщательная оценка пользы/риска проведения трансплантации костного мозга и органов у таких пациентов.

Лечение КМН, при отсутствии строгих показаний или невозможности проведения алло-ТГСК, существенно отличается от подходов при идиопатической АА. Иммуносупрессивная терапия, использование ростовых факторов и миметиков тромбопоэтинового рецептора не улучшает ответ и не влияет на общую выживаемость [51, 52, 53].

В крупных исследованиях была показана эффективность терапии андрогенами, за счет повышения теломеразной активности в стволовых кроветворных клетках и экспрессии TERT в лимфоцитах. Применение препарата даназол в дозе 800 мг/сут позволило достичь гематологический ответ у 83% испытуемых к 24 месяцам [54]. Лечение даназолом сопровождалось удлинением теломерных районов ДНК. Свою эффективность показали оксиметалон, флюоксиместерон и надронолон, гематологический ответ на данные препараты составляет 70% [55]. В случаях невозможности проведения алло-ТГСК и терапии андрогенами, необходимо проведение гемотрансфузионной заместительной терапии, хелации железа и профилактики инфекционных осложнений [5].

Нетрансплантационная тактика при циррозе печени заключается в предотвращении гепатотоксичности лекарственных препаратов путем тщательного определения показаний и снижения доз, отказа от приема алкоголя. Имеет значение своевременное оказание хирургической помощи при высоком риске кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода и использование неселективных бета-адреноблокаторов для снижения давления в воротной вене [56].

Консервативная тактика при фиброзе легких включает в себя отказ от курения и динамический контроль за течением заболевания. Варианты лечения ограничены, в настоящее время одобрены антифибротические препараты пирфенидон и нинтенаниб, их применение позволяет замедлить скорость ухудшения жизненной емкости легких на 50% в год, что должно приводить к повышению общей выживаемости, однако сообщается об отсутствии влияния терапии на улучшение симптомов и качества жизни [57, 58].

Перспективные методы лечения теломеропатий

Одной из перспективных опций лечения ТП является использование низкомолекулярных ингибиторов полимеразы PAPD5, вызывающей олигоденилирование и дестабилизацию теломеразной РНК (TERC). Продемонстрировано восстановление активности теломеразы и длины теломер в ВДК-индуцированных плюрипотентных стволовых клетках на мышинных моделях [59]. В исследовании низкомолекулярного активатора теломеразы TA-65 сообщается о достоверном увеличении длины теломер пациентов с ТП в сравнении с группой плацебо [60].

В исследовании научной группы Bär C. соавторами было показано, что генная терапия активаторами теломеразы на основе аденовирус-ассоциированных векторов, несущих ген TERT, улучшает общую выживаемость и показатели крови у мышей с апластической анемией, вызванной истощением теломер [61]. Однако, для внедрения в практику данных методов терапии необходимы дополнительные исследования на предмет их эффективности и безопасности.

Заключение

Теломеропатии это фенотипически гетерогенная группа врожденных заболеваний, проявляющаяся прогрессирующей дисфункцией различных органов, что характеризует ТП как мультидисциплинарную проблему.

Трудности диагностики данных заболеваний зачастую связаны с недостаточной осведомленностью о проблеме и междисциплинарной коопе-

рацией, отсутствием возможности проведения таких высокоспецифичных методов как NGS и измерение длины теломер. Однако определение пациента в группу риска по ТП за счет тщательного сбора анамнеза и проведения доступных физикальных, лабораторных и инструментальных методов обследования с последующим направлением в федеральные центры, поможет своевременно верифицировать диагноз.

Лечение ТП существенно отличается от схожих по фенотипу заболеваний. Несмотря на ограниченные терапевтические возможности при ТП, знание о наличии мутации позволяет спрогнозировать течение заболевания, отказаться от заведомо неэффективных методов лечения и

проявить настороженность в рамках данной патологии к другим членам семьи пациента.

Конфликты интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Источник финансирования: Исследование не имело источника финансирования

Вклад авторов:

Концепция и дизайн: все авторы

Сбор и обработка литературных данных: все авторы

Подготовка рукописи: все авторы

Окончательное одобрение рукописи: Кулагин А.Д.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Calado R.T., Young N.S. Telomere diseases. // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol.361, № 24. – P.2353-2365.
2. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Доклады Академии наук СССР. – 1971. – Т.201, № 6 – С.1496-1499.
3. Diotti R., Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. // *Nucleus.* – 2011. – Vol.2, №2. – P.119-135.
4. Mir S.M. et al. Shelterin Complex at Telomeres: Implications in Ageing. // *Clin. Interv. Aging.* – 2020. – Vol.2020, № 15. – P.827-839.
5. Niewisch M.R., Savage S.A. An update on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. // *Expert Rev. Hematol.* – 2019. – Vol.12, № 12. – P.1037-1052.
6. Roake C.M., Artandi S.E. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2020. – Vol.21, № 7. – P.384-397.
7. Agarwal S. Evaluation and Management of Hematopoietic Failure in Dyskeratosis Congenita. // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2018. – Vol.32, № 4. – P.669-685.
8. Dokal I. Dyskeratosis congenita. // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* – 2011. – Vol.2011, № 1. – P.480-486.
9. Feurstein S., Adegunsoye A., Mojsilovic D. et al. Telomere biology disorder prevalence and phenotypes in adults with familial hematologic and/or pulmonary presentations. // *Blood Adv.* – 2020. – Vol.4, № 19. – P.4873-4886.
10. Townsley D.M., Dumitriu B., Young N.S. Bone marrow failure and the telomeropathies. // *Blood.* – 2014. – Vol.124, № 18. – P.2775-2783.
11. Cronkhite J.T., Xing C., Raghu G. et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol.178, № 7. – P.729-737.
12. Kapuria D., Ben-Yakov G., Ortolano R. The Spectrum of Hepatic Involvement in Patients With Telomere Disease. // *Hepatology.* – 2019. – Vol.69, № 6. – P.2579-2585.
13. Schratz K.E., Haley L., Danoff S.K. et al. Cancer spectrum and outcomes in the Mendelian short telomere syndromes. // *Blood.* – 2020. – Vol.135, № 22. – P.1946-1956.
14. Townsley D.M., Dumitriu B., Young N.S. Bone marrow failure and the telomeropathies. // *Blood.* – 2014. – Vol.124, № 18. – P.2775-2783.
15. Yamaguchi H., Calado R.T., Ly H. et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol.352, № 14. – P.1413-1424.
16. Yamaguchi H., Baerlocher G.M., Lansdorp P.M. et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. // *Blood.* – 2003. – Vol.102, №3. – P.916-918.
17. Calado R.T., Regal J.A., Hills M. et al. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2009. – Vol.106, № 4. – P.1187-1192.
18. Wilson D.B., Link D.C., Mason P.J. et al. Inherited bone marrow failure syndromes in adolescents and young adults. // *Annals of Medicine.* – 2014. – Vol.46, № 6. – P.353-363.
19. Marrone A., Walne A., Tamary H. et al. Telomerase reverse-transcriptase homozygous mutations in autosomal recessive dyskeratosis congenita and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. // *Blood.* – 2007. – Vol.110, № 13. – P.4198-4205.
20. Atkinson J.C., Harvey K.E., Domingo D.L. et al. Oral and dental phenotype of dyskeratosis congenita. // *Oral Dis.* – 2008. – Vol.14, № 5. – P.419-427.
21. Kutbay N.O., Yurekli B.S., Erdemir Z. et al. A case of dyskeratosis congenita associated with hypothyroidism and hypogonadism. // *Hormones (Athens).* – 2016. – Vol.15, № 2. – P.297-299.
22. Powell J.B., Dokal I., Carr R. et al. X-linked dyskeratosis congenita presenting in adulthood with photodamaged skin and epiphora. // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2014. – Vol.39, № 3. – P.310-314.
23. Bongiorno M. et al. Malignant transformation of oral leukoplakia in a patient with dyskeratosis congenita. // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* – 2017. – Vol.124, № 4. – P.239-242.
24. Wegman-Ostrosky T., Savage S. A. The genomics of inherited bone marrow failure: from mechanism to the clinic. *Br. J. Haematol.* – 2017. – Vol.177, № 4. – P.526-542.
25. Alter B.P., Giri N., Savage S.A. et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Vol.150, № 2. – P.179-188.
26. Sipol A.A., Babenko E.V., Borisov V.I. et al. An inter-laboratory comparison of PNH clone detection by high-sensitivity flow cytometry in a Russian cohort. // *Hematology.* – 2015. – Vol.20, № 1. – P.31-38.
27. DeZern A.E., Symons H.J., Resar L.S. et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones to exclude inherited bone marrow failure syndromes. // *Eur. J. Haematol.* – 2014. – Vol.92, №6. – P.467-470.

28. Jyonouchi S., Forbes L., Ruchelli E., Sullivan K.E. Dyskeratosis congenita: a combined immunodeficiency with broad clinical spectrum – a single-center pediatric experience. // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2011. – Vol.22, № 3. – P.313-319.
29. Allenspach E.J., Belloodi C., Jeong D. et.al. Common variable immunodeficiency as the initial presentation of dyskeratosis congenita. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2013. – Vol.132, №1. – P.223-226.
30. Wagner C.L., Hanumanthu V.S., Talbot C.C. et. al. Short telomere syndromes cause a primary T cell immunodeficiency. // *J. Clin. Invest.* – 2018. – Vol.128, № 12. – P.5222-5234.
31. Nalysnyk L., Cid-Ruzafa J., Rotella P., Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. // *Eur. Respir. Rev.* – 2012. – Vol.21, № 126. – P.355-361.
32. Stuart B.D., Choi J., Zaidi S. et.al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. // *Nat. Genet.* – 2015. – Vol.47, № 5. – P.512-517.
33. Stanley S.E., Gable D.L., Wagner C.L. et. al. Loss-of-function mutations in the RNA biogenesis factor NAF1 predispose to pulmonary fibrosis-emphysema. // *Sci. Transl. Med.* – 2016. – Vol.8, № 351. – RA107.
34. Armanios M.Y., Chen J.J., Cogan J.D. et. al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol.356, № 13. – P.1317-1326.
35. Giri N., Ravichandran S., Wang Y. et.al. Prognostic significance of pulmonary function tests in dyskeratosis congenita, a telomere biology disorder. // *ERJ. Open. Res.* – 2019. – Vol.5, №4. – 00209-2019.
36. Gorgy A.I., Jonassaint N.L., Stanley S.E. et. al. Hepatopulmonary syndrome is a frequent cause of dyspnea in the short telomere disorders. // *Chest.* – 2015. – Vol.148, № 4. – P.1019-1026.
37. Лучкин А.В., Михайлова Е.А., Фидарова З.Т. и др. Семейный случай врожденного дискератоза. Клиническое наблюдение. // *Терапевтический архив.* – 2021. – Т.93, №7. – С. 818–825.
38. Дёмина А.И., Семченкова А.А., Кагирова З.Р., Попов А.М. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2018. – Т.17, № 4. – С.66-72.
39. Кагирова З., Дёмина И., Блохин Б., Румянцев А.Г. Длина теломер и здоровье детей. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* – 2017. – Т.16, № 4. – С.107-112.
40. Гальцева И.В., Филипенко М.Л., Давыдова Ю.О., и др. Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека. // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2021. – Т.66, № 3. – С.154-159.
41. Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Козлов Н.А. Апластическая анемия: иммунопатогенез, клиника, диагностика, лечение. // *Новосибирск: Изд-во «Наука».* – 2008. – 236 с.
42. Кулагин А.Д., Борисов В.И., Пронкина Н.В. и др. Частота и прогностическое значение укорочения теломерных участков ДНК при апластической анемии. // *Гематология и трансфузиология.* – 2014. – Т.59, № 1. – С.20.
43. Barkhatov I.M., Predeus A.V., Chukhlovin A.B. Next-generation gene sequencing and its applications in oncohematology. // *Oncohematology.* – 2016. – Vol.11, № 4. – P.56-63.
44. Ayas M., Nassar A., Hamidieh AA. et.al. Reduced intensity conditioning is effective for hematopoietic SCT in dyskeratosis congenita-related BM failure. // *Bone Marrow Transplant.* – 2013. – Vol.48, № 9. – P.1168-1172.
45. Dietz A.C., Orchard P.J., Baker K.S. et. al. Disease-specific hematopoietic cell transplantation: nonmyeloablative conditioning regimen for dyskeratosis congenita. // *Bone Marrow Transplant.* – 2011. – Vol.46, № 1. – P.98-104.
46. Nelson A.S., Vajdic C.M., Ashton L.J. et. al. Incident cancers and late mortality in Australian children treated by allogeneic stem cell transplantation for non-malignant diseases. // *Pediatr Blood Cancer.* – 2017. – Vol.64, № 1. – P.197-202.
47. Fioredda F., Iacobelli S., Korthof E.T. et. al. Outcome of haematopoietic stem cell transplantation in dyskeratosis congenita. // *Br. J. Haematol.* – 2018. – Vol.183, № 1. – P.110-118.
48. Silhan L.L., Shah P.D., Chambers D.C. et. al. Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. // *Eur. Respir. J.* – 2014. – Vol.44, № 1. – P.178-187.
49. Moschouri E., Vionnet J., Giostra E. et. al. Combined Lung and Liver Transplantation for Short Telomere Syndrome. // *Liver Transpl.* – 2020. – Vol.26, № 6. – P.840-844.
50. Kolb J.M., Conzen K., Wachs M. et. al. Liver Transplantation for Decompensated Cirrhosis Secondary to Telomerase Reverse Transcriptase Mutation. // *Hepatology.* – 2020. – Vol.72, №1. – P.356-358.
51. Gluckman E., Rokicka-Milewska R., Hann I. et. al. Results and follow-up of a phase III randomized study of recombinant human granulocyte stimulating factor as support for immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anaemia. // *Br. J. Haematol.* – 2002. – Vol.119, № 4. – P.1075-1082.
52. Desmond R., Townsley D.M., Dumitriu B. et. al. Eltrombopag restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug. // *Blood.* – 2014. – Vol.123, № 12. – P.1818-1825.
53. Socie G., Mary J.Y., Schrezenmeier H. et. al. Granulocyte-stimulating factor and severe aplastic anemia: a survey by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). // *Blood.* – 2007. – Vol.109, № 7. – P.2794-2796.
54. Townsley D.M., Dumitriu B., Liu D. et. al. Danazol treatment for telomere diseases. // *New Engl. J. Med.* – 2016. – Vol.374, № 20. – P.1922-1931.
55. Khincha P.P., Wentzensen I.M., Giri N. et. al. Response to androgen therapy in patients with dyskeratosis congenita. // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Vol.165, № 3. – P.349-357.
56. European Association for the Study of the Liver. Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. // *J. Hepatol.* – 2018. – Vol.69, № 2. – P.406-460.
57. Lancaster, L. et. al. Safety and survival data in patients with idiopathic pulmonary fibrosis treated with nintedanib: Pooled data from six clinical trials. // *BMJ Open Respir. Res.* – 2019. – Vol.6, № 1 – e.000397.
58. Noble P.W., Albera C., Bradford W.Z. et. al. Pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis of pooled data from three multinational phase 3 trials. // *Eur. Respir. J.* – 2016. – Vol.47, № 1. – P.243-253.
59. Nagpal N., Wang J., Zeng J. et. al. Small-Molecule PAPD5 Inhibitors Restore Telomerase Activity in Patient Stem Cells // *Cell Stem Cell.* – 2020. – Vol.26, № 6. – P.896-909.
60. Salvador L., Singaravelu G., Harley C.B. et.al. A Natural Product Telomerase Activator Lengthens Telomeres in Humans: A Randomized, Double Blind, and Placebo Controlled Study. // *Rejuvenation Res.* – 2016. – Vol.19, № 6. – P.478-484.
61. Bär C., Povedano J.M., Serrano R. et. al. Telomerase gene therapy rescues telomere length, bone marrow aplasia, and survival in mice with aplastic anemia. // *Blood.* – 2016. – Vol.127, № 14. – P.1770-1779.

Зенина М.Н.¹, Шилова Е.Р.¹, Черныш Н.Ю.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г.Санкт-Петербург.

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОВРЕМЕННЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ – ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Резюме. В статье рассматриваются новые возможности исследования показателей общего анализа крови (ОАК) с помощью современных гематологических анализаторов. Данные, полученные на гематологических анализаторах, помогают в диагностическом поиске и выборе тактики лечения. Современные гематологические анализаторы с высокой точностью оценивают известные характеристики клеток крови и вычисляют

новые ретикулоцитарные и тромбоцитарные индексы. В лекции оцениваются возможности наиболее часто используемых автоматических анализаторов.

Ключевые слова: гематологический анализатор, общий анализ крови, фракции незрелых ретикулоцитов и тромбоцитов

Zenina M.N.¹, Shilova E.R.¹, Chernysh N.Y.²

²Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.Petersburg

²Almazov National Medical Research Center, St.Petersburg

MODERN HEMATOLOGICAL ANALYZERS – OPPORTUNITIES AND LIMITATIONS

Abstract. The article discusses new possibilities for the study of blood parameters using modern hematological analyzers. The data obtained on hematological analyzers help in the diagnostic search and the choice of treatment tactics. Modern hematology analyzers evaluate the known characteristics of blood cells and calculate new reticulocyte and platelet

indices with high accuracy. The capabilities of the most commonly used automatic analyzers are evaluated in this lecture.

Key words: hematology analyzer, complete blood count, fractions of immature reticulocytes and platelets.

Эра автоматизации гематологических исследований началась в двадцатые годы прошлого столетия, когда доктор Wintrobe предложил количественно определять содержание лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрита и концентрации гемоглобина с использованием центрифуги и стеклянной трубки [1]. Этот метод существует и сегодня под названием QBS (Quantitative Buffy Coat). В тридцатые – пятидесятые годы прошлого века число элементов крови определяли фотоэлектрически (Moldavan, 1934), оптически-турбидиметрически (Around, 1945), измерением рассеянного света (Langercrantz, 1950; Hodkinson, 1953). Начало же массовой автоматизации исследований в гематологии положил в 1956 г доктор Coulter. Будучи в конце 40-х годов XX века служащим Военно-морского флота США, Wallace H. Coulter разработал импедансометрический метод определения количества и размера частиц [2]. Главным образом он был предназначен для быстрого подсчета клеток крови путем измерения изменения электропроводности их суспензии в проводящей жидкости, проходящей через отверстие малого диаметра. Счетчик Культера Model A, разрабо-

танный братьями Wallace H. и Joseph R. Coulter и вышедший в продажу в 1954 году, стал первым коммерческим прибором подобного типа, предназначенным для гематологических исследований. Учитывая тот факт, что эти приборы были первыми счетчиками и анализаторами размера частиц, они сыграли главную роль в развитии технологии клеточного анализа. С тех пор продолжается непрерывный процесс эволюции и развития этого метода. В настоящее время практически все гематологические анализаторы используют принцип импедансометрии (Культера). Клетки считаются в изотоническом растворе, что исключает деформацию и неправильное определение их размера. Этот метод позволяет определить большинство эритроцитарных показателей, связанных с объемом клетки. В литературе этот способ обозначают DC (direct current- измерение сопротивления).

По количеству измеряемых параметров и степени дифференциации лейкоцитов гематологические анализаторы на несколько классов. Приборы, измеряющие порядка десяти и менее параметров, без дифференциации лейкоцитов, практически не встречаются уже на практике).

Следующий класс гематологических анализаторов, или 3-diff – это автоматические гематологические анализаторы, определяющие до 20 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а также частичную дифференцировку лейкоцитов на три популяции - лимфоциты, моноциты (средние клетки) и гранулоциты. Приборы этой группы используют для подсчета клеток только импедансным методом, а гемоглобин измеряют фотометрическим методом.

Более сложные технологически 5 diff анализаторы позволяют проводить развернутый анализ крови, в том числе полную дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты), получать гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему и скатерограммы. Получить эти показатели стало возможно с использованием наряду с методом Культера новых, усовершенствованных технологий, таких как, например, радиочастотный анализ (RF – radio frequency), который является разновидностью кондуктометрического метода и используется на некоторых гематологических анализаторах. При прохождении апертурного отверстия объектом в токе высокой частоты также возникают сигналы, амплитуда которых зависит от размеров ядра, плотности ядерного матрикса и цитоплазматических включений. Эти сигналы в большей степени отражают характер внутренней структуры клетки, по сравнению с классическим кондуктометрическим измерением. В фотооптическом методе (регистрация светорассеяния и поглощения) электрическое поле заменено использованием источника света (чаще всего лазерным). Оптические детекторы основаны на пропускании суспензии клеток по капилляру через сфокусированный луч света, поступающий от лазера или лампы. В момент пересечения луча клеткой происходит поглощение или рассеяние света, которое обусловлено клеточным размером, формой, плотностью, окрашиванием и гранулярностью внутриклеточных структур. Рассеянный свет от клеток и частиц состоит из дифракционных, рефракционных и отражающих компонентов. Светорассеяние для характеристики клеток измеряется разными путями. При малых углах относительно оси падающего света преобладает дифракция. Рассеяние вблизи первого минимума переднего светового дифракционного изображения используется для измерения размеров объекта. С возрастанием угла рассеивания увеличивается значение рефракционных эффектов. Поскольку рефракционные лучи пересекают внутренности клетки, регистрируемые при этом сигналы в большей степени отражают внутриклеточную микроструктуру. Преломление

зависит от поглощения и может применяться для измерения способности клеток окрашиваться поглощающими красителями. Ослабление осевого света (поглощение) также используется для проточного анализа.

Для дифференцировки основных групп гранулоцитов используется измерение активности пероксидазы в лейкоцитах (PEROX channel), когда определяют одновременно абсорбцию и дисперсию видимого света. Эти два сигнала образуют картину разделения клеток, которые отличаются друг от друга объемом и содержанием пероксидазы. Наряду с методом PEROX употребляется также метод BASO. Благодаря использованию специфического лизиса базофилов, в отличие от других лейкоцитов, не теряют цитоплазмы и считаются отдельно. В канале BASO измерение дисперсии лазерного света под углом 2-3° и 5-15° позволяет различать клетки в зависимости от формы ядра.

Некоторые производители пошли по пути использования флуоресцентных красителей, что связано с тем, что флуоресцентное излучение прямо пропорционально специфическим клеточным компонентам. Концентрация красителя для исследований очень низкая, при этом нефлуоресцирующие соединения могут становиться флуоресцирующими при взаимодействии с внутриклеточными структурами или ферментами. Изучение поляризации флуоресценции позволяет охарактеризовать такое важное биологическое свойство как вязкость, или текучесть мембран, которое отражает функциональное состояние клетки. При поляризации лазерного излучения флуоресцирующего излучения и интенсивности поляризованного света уменьшается. Поляризация светорассеяния используется в специализированной технологии «MAPSS» (поляризация многоугольного светорассеяния), применяемой в гематологических анализаторах для дифференцировки морфологических элементов крови.

Еще один метод, прекрасно зарекомендовавший себя для измерения и дифференцировки клеток крови, это, так называемый, метод трехмерного анализа лейкоцитов (VCS). Принцип определения лейкоцитов использует три особенности клеток, анализируемые одновременно: объем (Volume), электропроводность (Conductivity) и дисперсия лазерного света (Scatter). Основные параметры, оцениваемые по этому методу – это объем клеток, измерение импеданса низкой частоты (DC), кондуктометрическое измерение высокой частоты (RF) и дисперсия света (DF1).

Наиболее современные 5 diff+ и 6 diff анализаторы, располагающие расширенными возможностями – это сложные аналитические системы, выполняющие не только развернутый анализ крови с дифференцировкой лейкоцитов по пяти параметрам, но и подсчет и анализ ретикулоцитов, неко-

торых субпопуляций лимфоцитов и т.д. При этом наблюдается интеграция проточной цитометрии с гематологическими анализаторами с целью увеличения специфичности методов выявления основных количественных характеристик морфологии клеток крови и дифференциации клеток с определением их ростковой принадлежности. В таких анализаторах используют моноклональные антитела для дифференциации лимфоцитов (CD4, CD8), ретикулоцитов (CD73), тромбоцитов. Такие приборы при необходимости комплектуются блоком для автоматического приготовления и окраски мазков из заданных образцов крови [3].

Применение многопараметровых гематологических анализаторов позволяет автоматизировать процесс подсчета клеток крови и получить дополнительные, высокоинформативные характеристики клеток крови. Однако следует принимать во внимание различие аналитических возможностей различных типов гематологических анализаторов, ограниченную способность некоторых моделей анализаторов проводить полную дифференцировку лейкоцитов. В основе работы анализаторов 3diff лежит кондуктометрический метод. Анализаторы 5diff и более используют в своей работе комбинации разных методов. И гематологические анализаторы, дифференцирующие лейкоциты на три популяции, могут использоваться только для динамического наблюдения за состоянием крови пациентов, но не для постановки диагноза, требующего подсчет формулы крови.

В гематологических анализаторах всех классов представлены показатели общего анализа крови количественные эритроцитарного, лейкоцитарного и тромбоцитарного звеньев. Однако, набор параметров отличаются от класса и производителя оборудования.

К эритроцитарным параметрам относятся следующие измеряемые показатели:

- Количество эритроцитов (RBC - red blood cell) - $\times 10^9/\text{л}$
- концентрация гемоглобина (Hb, HGB, hemoglobin) - г/л
- гематокрит (Hct, HCT, hematocrit) - %

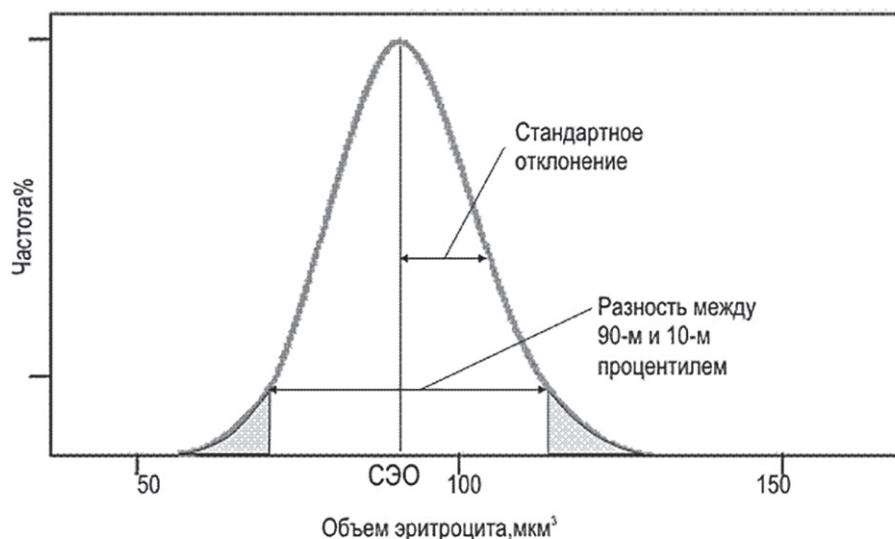
Эритроцитарные индексы, относящиеся к расчетным параметрам это MCV, MCH и MCHC, где MCV - средний объем эритроцита (mean corpuscular volume) измеряется в мкм^3 или фемтолитрах (фл), MCH - среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (mean corpuscular hemoglobin) и MCHC - средняя концентрация гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin concentration). По MCH, измеряемому в абсолютных единицах (норма 27-31 пг) анемии делят на нормо-, гипо- и гиперхромные. MCV меняется в течение жизни и у новорожденных достигает 128 фл, далее в первую неделю жизни снижается до

100, к году составляет 77-79 фл и в возрасте 4-5 лет нижняя граница нормы (80 фл) стабилизируется. MCV у взрослых ниже 80 фл оценивается как микроцитоз, выше 95 фл - как макроцитоз. Концентрация гемоглобина (MCHC) внутри эритроцита в норме составляет 33-37 г/дл. Это самый стабильный гематологический показатель. Любая неточность, связанная с определением гемоглобина, гематокрита, MCV, приводит к увеличению MCHC, поэтому этот параметр чаще всего используется как индикатор ошибки прибора, или ошибки, допущенной при подготовке пробы к исследованию. Гематологическая гистограмма - это графическое изображение распределения различных популяций клеток по их количеству и размеру (объему). Гистограмма распределения эритроцитов по объему RDW (red cell distribution width) - это показатель анизоцитоза эритроцитов. Рассчитывается как коэффициент вариации среднего объема эритроцитов (норма 11,5 - 14,5%).

Параметр, получаемый из гистограмм RDW-CV - это коэффициент вариации отклонения размера эритроцитов от среднего значения (68,26% всей области распределения эритроцитов). Рассчитывается по формуле $\text{RDW-CV} (\%) = \text{SD} / \text{MCV} \times 100$, где SD - стандартное среднее квадратичное отклонение. На этот показатель влияет MCV, поэтому при микроцитозе, так и при макроцитозе отмечается тенденция к увеличению RDW-CV.

В некоторых гематологических анализаторах имеется еще один расчетный показатель - RDW-SD, который независим от MCV и представляет собой прямое измерение ширины эритроцитарной гистограммы на уровне 20% пика кривой. При этом высота пика RBC- гистограммы принимается за 100%. Норма RDW-SD - 42 ± 5 фл. Клинически значимое значение $\text{RDW-SD} > 60$ фл. Оба показателя RDW определяют вариабельность эритроцитов по объему. Повышение RDW предполагает присутствие смешанной популяции клеток (нормоциты и микроциты, или макроциты и нормоциты). Более чувствительным показателем при наличии минорной популяции макроцитов или микроцитов является RDW-SD, так как он измеряет нижнюю часть кривой распределения эритроцитов по объему. Показатель RDW характеризует колебания объема клеток внутри популяции и не связан с абсолютной величиной объема эритроцитов. При наличии в крови популяции эритроцитов с измененным, но достаточно однородным размером (например, микроциты) значения RDW могут быть в пределах нормы (11,5 - 14,5%). При выраженном анизоцитозе эритроцитов показатель MCV, характеризующий средний объем всей клеточной популяции, является нормальным, а RDW будет повышенным [4].

Рисунок 1. Эритроцитометрическая кривая (схема по Harrison).



Ширину эритроцитометрической кривой можно охарактеризовать с помощью коэффициента вариации (отношение стандартного отклонения к среднему эритроцитарному объему) и разности между 90-м и 10-м процентилем (рисунок 1).

Таким образом, используя параметры гематологических анализаторов класса 3 diff, мы можем определить характер изменений эритроидного ростка. При снижении гемоглобина – какая именно анемия у пациента – микроцитарная, нормоцитарная, или макроцитарная, гипо-, гипер- или нормохромная. К сожалению, никакие изменения формы эритроцитов приборы данного класса показывать не могут. В случае, если у пациента имеется несоответствие объема и диаметра клеток (при врожденной микросфероцитарной анемии), приборные значения не показывают изменений эритроцитов и оценить проблему можно только при исследовании окрашенных препаратов под микроскопом. Ограниченные возможности гематологических анализаторов этого класса не позволяют сократить объем выполняемых микроскопических исследований, и основная часть диагностики приходится на микроскопию, выполняемую врачами.

В анализаторах класса 5diff представлен один из новых эритроцитарных индексов CHCM (corpuscular hemoglobin concentration mean), определяющий среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (г/дл) получаемый уже непосредственно прямым измерением. Распределение клеток по содержанию гемоглобина измеряется, фиксируется гистограмма и вычисляются два параметра – средняя концентрация гемоглобина в клетке, которая в отличие от MCHC обозначается CHCM (cellular hemoglobin concentration mean) и ширина распределения клеток по концентрации гемоглобина (HDW – hemoglobin distribution width).

К измеряемым показателям относится также CH – содержание гемоглобина в эритроцитах (cellular hemoglobin content pg). И еще один из новых показателей, это HDW, или ширина распределения концентрации гемоглобина в эритроцитах hemoglobin concentration distribution width pg/dL.

В настоящее время в высокотехнологичных анализаторах появились новые эритроцитарные показатели, такие как, подсчет фрагментов эритроцитов, или FRC (fragmented cells (RBC-F), которые имеют особое значение в оценке тромботических микроангиопатий. Определяется также процент гипохромных эритроцитов (Hуро%), что используется в диагностике гипохромных анемий, особенно при латентном дефиците железа и мониторинге терапии рекомбинантным эритропоэтином. Наличие более 10% гипохромных эритроцитов является индикатором железодефицитного состояния.

Для оценки регенераторной способности системы кроветворения необходимо исследование ретикулоцитов. Использование современных автоматизированных систем позволяет с достаточной степенью надежности определить ряд параметров, позволяющих количественно оценить степень расстройств эритропоэза, в том числе, на стадии созревания ретикулоцитов. Для автоматизированного анализа ретикулоцитов используют метод проточной цитометрии. В различных анализаторах используются разные реагенты и принципы измерения ретикулоцитов, такие как нефлюорохромная краска новый метиленовый синий; флуоресцирующие красители (тиазол оранжевый, тиофлавин Т, полимитин, цианин CD4K530, акридин оранжевый, оксазин 750 и др.). Анализ ретикулоцитов можно проводить и на проточных цитофлуориметрах с использованием моноклональных антител, меченых флуорохромом (BD Retic-Count).

Автоматизированный подсчет ретикулоцитов отличается значительно большей точностью (исследуются более 30000 эритроцитов) и воспроизводимостью (коэффициент вариации составляет около 6%), обеспечивает возможность получения новых показателей, оценивающих степень зрелости ретикулоцитов по измерению в них содержания РНК. Анализатор позволяет определять: относительное (RET%) и абсолютное (RET#) количество ретикулоцитов, индекс созревания ретикулоцитов (IMM% или IRF), средний объем ретикулоцитов (MRV), а также разделять ретикулоциты на 3 класса по степени зрелости:

- RET L — ретикулоциты с низким содержанием РНК, наиболее зрелые

- RET M — ретикулоциты со средним содержанием РНК

- RET H — ретикулоциты с высоким содержанием РНК, самые молодые.

В 1989 году Б. Дэвис (Davis B.H.) и Н. Бигелоу (Bigelow N.C.) предложили индекс зрелости ретикулоцитов, или фракцию незрелых ретикулоцитов (IRF) в зависимости от содержания в ретикулоцитах РНК, как параметр, отображающий эффективность эритропоэза [5].

IRF (Immature Reticulocyte Fraction) является показателем степени зрелости ретикулоцитов и составляет в норме 2-12%. Эта фракция объеди-

няет RET M и RET H и характеризуется также такими показателями, как HLR% (High Light Scatter Reticulocyte) - относительное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием (количество незрелых ретикулоцитов) и HLR# (HighLight Scatter Reticulocyte) — абсолютное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием.

Показатели IRF используются для мониторинга костномозговой регенерации после трансплантации костного мозга, интенсивной химиотерапии, терапии дефицита железа, витамина B12, или фолиевой кислоты, определения степени токсического воздействия химиопрепаратов на костный мозг, дифференциальной диагностики анемий, детекции апластических кризов.

Один из методов, используемых для анализа ретикулоцитов в анализаторах, основан на уже упомянутой выше трехмерной VCS технологии. Для окраски ретикулоцитов применяется краситель, идентифицирующий РНК в ретикулоцитах (ReticPrep реагент А, модифицированный новый метиленовый синий), и стабилизирующий фиксирующий реагент (ReticPrep реагент В) – закисленный гипотонический раствор, вызывающий набухание эритроцитов до сферической формы без их фрагментации и обеспечивающий выход гемоглобина во внешнюю среду.

Таблица 1. Референтные значения ретикулоцитарных показателей (анализаторы компании Beckman Coulter)

Параметры	Единицы измерения	Референтные значения (Beckman Coulter)
Retic %	%	0,45 – 2,28
Retic # (абсолютное количество ретикулоцитов)	$\times 10^6/\text{мклL}$	0,02 – 0,11
IRF (содержание незрелых ретикулоцитов)		0,163 – 0,362
MRV (средний объем ретикулоцитов)	fl	102,73 – 124,89
MSCV (средний объем сферулированных ретикулоцитов)	fl	84 – 104
HLR % (относительное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием)	%	0,07 – 0,71
HLR# (абсолютное количество ретикулоцитов с высоким светорассеиванием)	$\times 10^6/\text{мкл}$	0,003 – 0,050

Другим методом анализа ретикулоцитов является технология MAPSS™ (многоугловое поляризационное разделение пучка) и трехцветная флуоресцентная технология. С помощью этой технологии можно проводить полный анализ ретикулоцитов и их классификацию, а также измерять индекс молодых ретикулоцитов (IRF). Результаты представляются с пороговой меткой, позволяющей четко разделять взрослые и молодые ретикулоциты. Значение IRF представляется в процентном соотношении к общему числу ретикулоцитов [6].

Для получения параметров ретикулоцитов

нашел применение также метод проточной цитофлуориметрии. Флуоресцентный краситель полиметин избирательно окрашивает РНК ретикулоцитов и позволяет использовать для их анализа диодные лазеры. В проточной кювете клетки пересекают луч полупроводникового лазера длиной 633 нм. При этом происходит рассеивание луча под большим и малым углами и возбуждение флуоресцентного красителя. При анализе полученных сигналов измеряются отклонение лазерного луча под малым углом (прямое светорассеивание FSC), зависящее от размера клетки, отклонение лазерного

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

луча под углом до 900 (боковое светорассеивание SSC) зависящее от плотности структур и детектирование флуоресцентного сигнала (SFL), который регистрируется параллельно с боковым светорассеиванием и позволяет судить о содержании РНК в клетках. При этом в каждом образце просчитывается более 30000 клеток. Используемая технология обеспечивает точный подсчет ретикулоцитов даже при их предельно низких концентрациях. Ретикулоциты дифференцируются в зависимости от степени зрелости, размерам и средней величине

ну RET-Y. Диапазон значений RET-Y ch 1630-1860 AU (или 171,0 – 196,3 в зависимости от модификации прибора). Согласно данным S. Franck, J. Linszen, M. Messinger и L. Thomasa, используя регрессивную формулу $y = 5.5569 X e^{0.001x}$ эти значения соответствуют их гемоглобиновому эквиваленту RET-He с референтными значениями 28,2–35,7 pg.

Референтные значения ретикулоцитарных показателей при использовании различных гематологических анализаторов приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 2. Референтные значения ретикулоцитарных показателей (анализаторы компании Sysmex – XT – 2000i)

Параметры	Единицы измерения	Референтные значения (Sysmex – XT – 2000i)
Retic %	%	0,59 – 2,07
Retic# (абсолютное количество ретикулоцитов)	10^{12} x/L	22,4– 93,5
IRF (содержание незрелых ретикулоцитов)		2,1 – 17,5
MFR		1,8 – 14,4
HFR		0 – 2,4
RET – Ych*	AU	171,0 – 196,3
RET – He	pg	28,2 – 36,4

*RET-Ych - 1630-1860 AU (или 171,0 – 196,3 в зависимости от модификации прибора)

Используемая технология позволяет определить такой уникальный параметр, как содержание гемоглобина в ретикулоцитах CHr, с референтными значениями 28–35 pg.

Использование в диагностической практике новых ретикулоцитарных показателей в сочетании с эритроцитарными индексами и результатами традиционных морфологических исследований мазков периферической крови значительно сужают выбор из возможных нозологических форм, для разграничения которых используют дополнительные исследования. Кроме того, ретикулоцитарные параметры позволяют проводить мониторинг состояния пациентов и эффективности проводимой терапии [7].

Клинический анализ крови невозможен без определения параметров лейкоцитов (WBC – white blood cells, $\times 10^9$ /л). Рассмотрим, какие лейкоцитарные параметры получают на гематологических анализаторах различных классов. В приборах 3 diff измерение числа лейкоцитов проводится после полного лизиса эритроцитов. Все частицы размером более 35 фл считаются как лейкоциты. Тромбоциты, размер которых меньше порогового значения 35 фл, исключаются из подсчета. Коэффициент вариации (CV) при автоматическом определении этого показателя составляет 2–3%. Количество параметров лейкоцитарной формулы, определяемое на гематологическом анализаторе, варьирует от 6 до 10 с учетом относи-

тельного и абсолютного количества клеток. Гематологические анализаторы 3diff дифференцируют лейкоциты на три популяции (лимфоциты, средние клетки и гранулоциты) и определяют как относительное, так и абсолютное их содержание. В гематологических анализаторах 5 diff подсчитываются все 5 классов лейкоцитов, встречающихся в норме: нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы и базофилы. При этом методы, используемые в приборах разных производителей, отличаются. Главным же преимуществом автоматического подсчета лейкоцитарной формулы является повышение точности результатов за счет измерения большого количества клеток по сравнению с микроскопическим исследованием [8].

Технология проточной цитометрии, используемая в гематологических анализаторах 5 diff+ и 6 diff, позволяет “заглянуть” внутрь клетки, когда по количеству нуклеиновых кислот можно судить об их метаболической активности. Это позволило разработать новые параметры, позволяющие представить количественную оценку реактивных изменений системы кроветворения пациента в ответ на воспаление и инфекции: статус активации нейтрофилов (NEUT-RI, NEUT-GI), незрелые гранулоциты (IG) и активированные лимфоциты (RE-LYMP, AS-LYMP).

Все гематологические анализаторы, от самых простых до сложных, определяют абсолютное чис-

ло тромбоцитов (PLT – platelet, $\times 10^9/\text{л}$). Подсчет тромбоцитов гематологическими анализаторами проводится без предварительного лизиса эритроцитов, на основании различий в размере тромбоцитов и эритроцитов. Это может создавать проблемы при дифференцировке больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов) или их фрагментов (шизоцитов), а также фрагментов цитоплазмы лейкоцитов (клеточный дебрис). В большинстве приборов оценивают такие параметры, как средний объем тромбоцитов (MPV, фл), ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW, %), тромбокрит (PCT, %). В то же время, гематологические анализаторы различных фирм отличаются по набору дополнительных критериев оценки тромбоцитарного звена. Современные технологии (кондуктометрический метод с гидродинамическим фокусированием, проточная цитометрия), используемые в высокотехнологичных гематологических анализаторах, позволяют получить более подробную информацию о клеточных популяциях в виде таких параметров, как количество больших тромбоцитов (L-PLT); процент объема крупных тромбоцитов (> 12 фл) от всего объема тромбоцитов (P-LCR); показатель фракции незрелых тромбоцитов (IPF); средняя концентрация компонентов тромбоцитов (MPC, г/дл), средняя сухая масса тромбоцитов (MPM, пг), ширина распределения тромбоцитов по концентрации компонентов (PCDW, г/дл), ширина распределения тромбоцитов по сухой массе (PMDW, пг). Данные параметры можно интерпретировать только при строгом соблюдении преаналитического этапа (правильный выбор антикоагулянта, время выполнения исследования и т.д.) и могут оказать большую помощь клиницистам в оценке тромбоцитарного звена [9].

Следует помнить о возможных ошибках при подсчете тромбоцитов - ложном завышении при выраженном микроцитозе эритроцитов, криоглобулинемии, гемолизе, наличие фрагментов эритроцитов и лейкоцитов. Ложное занижение получают при агрегации тромбоцитов, тромбоцитарном "сателлизме" (прилипанию тромбоцитов к лейкоцитам), наличии гигантских тромбоцитов, агрегации эритроцитов, тромбообразовании, взятии крови с гепарином, гипертромбоцитоз (более $1000 \times 10^9/\text{л}$).

У некоторых пациентов может происходить спонтанная агрегация тромбоцитов, или, так называемая, ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения.

Средний объем тромбоцитов MPV (mean platelet volume фл) в норме варьирует от 7,4 до 10,4 фл и имеет тенденцию к увеличению с возрастом. В течение первых двух часов после взятия крови с ЭДТА происходит «набухание» тромбоцитов с изменением их объема и соответственно увеличением MPV. При наличии макротромбоцитов порог измерения для тромбоцитов может быть превышен, и они не попадают в счет, что приводит к занижению MPV.

Небольшие фрагменты эритроцитов и лейкоцитов могут препятствовать измерению MPV. Тромбоциты могут быть в агглютинатах эритроцитов, что приведет к ошибочным результатам MPV. Подобные ошибки можно проверить по аномальным значениям MCH и MCHC. MPV рассматривается как маркер интенсивности тромбоцитопоэза, поскольку молодые пластинки более крупные, или как маркер агрегационной активности тромбоцитов, так как увеличивается при их активации и превращении из дисков в сферы с псевдоподиями на начальных этапах агрегации. Несмотря на большое количество исследований, свидетельствующих о высокой прогностической ценности MPV при различных состояниях, следует учитывать особенности трактовки результатов измерения данного параметра. Во многих исследованиях показано, что MPV не имеет одного интервала нормальных значений, а существует нелинейная, обратная зависимость между MPV и количеством тромбоцитов у здоровых лиц с нормальным их числом. Поэтому некоторые авторы рекомендуют при решении вопроса о соответствии величины MPV нормальным значениям вместо одного интервала для каждого прибора разработать номограмму, которая отражает указанную зависимость.

Другими параметрами анализаторов, связанными с размером тромбоцитов, являются L-PLT – число крупных тромбоцитов и P-LCR – процент объема крупных тромбоцитов (> 12 фл) от всего объема тромбоцитов. Большие тромбоциты, вероятно, являющиеся молодыми формами, дают более высокий сигнал флюоресценции. Процент L-PLT рассчитывается от общего количества тромбоцитов и предположительно является индикатором активности тромбоцитопоэза в костном мозге. Общее число тромбоцитов включает суммарный счет обычных и крупных тромбоцитов. При увеличении числа L-PLT возрастает риск тромбообразования.

На анализаторах 5 diff + доступен показатель IPF (фракции незрелых тромбоцитов), который рассчитывается по соотношению объема и содержанию нуклеиновых кислот в клетках, меченных полиметином (проточная цитометрия). Установлено, что данный параметр имеет одинаковые референтные интервалы в разных лабораториях, что делает его более удобным для клинического использования. В целом, показатели L-PLT и IPF являются более чувствительными параметрами, чем MPV, так как не зависят от распределения объемов по различным значениям.

Для анализа степени однородности популяции тромбоцитов используют параметры PDW, PCDW и PMDW. PDW – показатель, отражающий степень гетерогенности тромбоцитов по размеру (анизцитоз тромбоцитов). Величина PDW в среднем составляет 10–15%. Этот показатель находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов и периода их жизни. В каждом конкретном случае

важна не только величина PDW, но и ее изменение во времени, а также связь с другими тромбоцитарными показателями. Одновременное присутствие фракций мелких (зрелых, неактивных) и больших (молодых, активированных) тромбоцитов ведет к увеличению PDW, но при этом MPV может оставаться в пределах нормы. Сочетание повышенного PDW с увеличением MPV отражает нарастание числа крупных тромбоцитов при усилении их продукции и активации. Ложное увеличение PDW может быть признаком присутствия агрегатов тромбоцитов, микроэритроцитов, фрагментов эритроцитов.

Параметры PCDW и PMDW характеризуют степень гетерогенности тромбоцитов по MPC и MPM и рассчитываются как стандартные среднеквадратичные отклонения концентрации компонентов тромбоцитов или сухой массы тромбоцитов от их средних значений. PCDW можно использовать для контроля пригодности (жизнеспособности) тромбоцитарных концентратов при трансфузиях. По некоторым данным, пациенты с высокими PCDW и PMDW имеют более высокие риски смертельного исхода при ДВС.

РСТ – тромбокрит, отражает долю тромбоцитов в общем объеме крови. Нормальные значения варьируют в пределах от 0,15 до 0,35%. У здорового человека при уменьшении числа тромбоцитов усиливается тромбоцитопоз, в циркулирующую кровь попадает большое число молодых, более крупных тромбоцитов, что ведет к увеличению MPV. При увеличении количества циркулирующих тромбоцитов снижается продукция их в костном мозге, в результате снижается процент крупных форм и уменьшается MPV. Однако при нарушении этого равновесия происходит или уменьшение РСТ, что в конечном счете приводит к патологии первичного гемостаза и риску возникновения кровотечений, или повышение РСТ, что увеличивает риск тромбозов. По литературным данным, РСТ является более чувствительным параметром для оценки риска возникновения кровотечений, чем число тромбоцитов. Снижение

параметра РСТ до уровня <0,1% обуславливает возникновение послеоперационных кровотечений у пациентов с развивающейся тромбоцитопенией.

Оценка тромбоцитарных параметров с использованием гематологических анализаторов является дешевым и быстрым методом анализа состояния тромбоцитов. Однако тромбоцитарные индексы довольно вариабильны в зависимости от преаналитических факторов. В частности, время после венопункции является критическим для определения параметров активации тромбоцитов *in vivo*. Тромбоциты могут быть спонтанно активированы *in vitro*, что доказано зависимыми от времени изменениями тромбоцитарных параметров. В случае хранения образцов крови в пробирках с КЗЭДТА при комнатной температуре в течение 2 часов наблюдается ступенчатое увеличение MPV, уменьшение MPC, увеличение MPM и снижение PCDW. Эти колебания не зависят от тяжести сопутствующих ССЗ. По данным многих авторов оптимальным временем для исследования MPV в пробирках с ЭДТА можно считать 2 ч после взятия крови. Также существуют определенные сложности с установлением референтных интервалов (необходимо учитывать антикоагулянт, возраст пациента, модель анализатора). Все это создает определенные трудности при интерпретации результатов тромбоцитарных параметров.

Таким образом, современные гематологические анализаторы позволяют получить достаточно полную информацию об изменениях крови пациента. Нужно помнить, что объем информации зависит от класса прибора и его потенциальных возможностей. Применение современных гематологических анализаторов не исключают роль врачей клинической лабораторной диагностики, а существенно меняют их функции. Появляется возможность более полной оценки состояния гемопоэза больного и оформления заключения о предположительном диагнозе, необходимых исследованиях и наблюдениях в процессе лечения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kushner J. P. Maxwell Myer Wintrobe: Influential Teacher in the Field of Hematology MD// The Hematologist. – 2007 – Vol.4, № 6
2. Родченкова В. В. Звезды аналитического приборостроения. Уоллес Генри и Джозеф Ричард Культеры// Аналитика – 2021 – выпуск 4, № 3. – С. 12-14.
3. Интерпретация показателей крови на автоматическом анализаторе / Д.С. Сачилович, О.А. Шумак, Ж.Н. Пугачева, Е.П. Лукьяненко, Т.П. Кляпец. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2018 – 26 с.
4. Погорелов В. М., Иванова Л. А., Козинец Г. И. Эффективность и информативность гематологических анализаторов // Гематол. и трансфузиол. – 2012. – т. 57, № 3. – С.30-37.
5. Davis B.H., Bigelow N.C. Flow cytometric reticulocyte quantification using Thiazole Orange provides clinically useful reticulocyte maturity index // Archives of Pathology and Laboratory Medicine. – 1989. –Vol.113. – P.684-689.
6. Kratz A., Lee S.H., Zini G., Riedl J.A, Hur M., Machin S. International Council for Standardization in Haematology. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations // Int J Lab Hematol. – 2019. – Vol.41, №4. – P. 437-447.
7. Chabot-Richards D.S., George T.I. White blood cell counts: reference methodology // Clin Lab Med. 2015. - Vol.35, №1. – P.11-24.
8. Sukhacheva E. Comments re article on comparison of performance and abnormal cell flagging of two automated hematology analyzers: Sysmex XN 3000 and Beckman Coulter DxH 800// Int J Lab Hematol. –2020. – Vol. 42, №3.
9. Bruegel M., Nagel D., Funk M., Fuhrmann P., Zander J., Teupser D. Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000 // Clin Chem Lab Med. – 2015 Vol. 53, №7. – P.1057-1071.

Папаян Л.П.

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России»

**БОЛЕЗНЬ ВИЛЛЕБРАНДА: ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ОСОБЕННОСТИ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ (ЛЕКЦИЯ)**

Parayan L.P.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia

**VON WILLEBRAND DISEASE: ETIOLOGY, PATHOGENESIS, PECULIARY OF
LABORATORY DIAGNOSTICS (LECTURE)**

Резюме. В лекции обобщены современные данные о патогенезе одной из самых частых форм среди врожденных геморрагических диатезов – болезни Виллебранда; представлены клинико-лабораторная характеристика трех основных типов заболевания и диагностические возможности их разделения. Лекция предназначена для врачей гематологов, врачей клинической и лабораторной диагностики, слушателей курсов повышения квалификации, клинических ординаторов и врачей широкого профиля.

Ключевые слова. Болезнь Виллебранда, фактор Виллебранда, нарушение гемостаза, диагностика.

Болезнь Виллебранда (БВ) – самая распространенная форма среди известных геморрагических заболеваний, которая диагностируется у лиц обо-его пола. Заболевание обусловлено снижением количества или нарушением функции фактора Виллебранда (фВ), что определяет значительную вариабельность ее клинико-лабораторных проявлений. Приблизительно у 70% пациентов заболевание имеет легкое клиническое течение, у остальных наблюдаются среднетяжелые или тяжелые проявления геморрагического синдрома.

БВ встречается у 0,5-1% населения, однако распространенность клинически значимых форм заболевания, требующих оказания медицинской помощи, составляет 1–2 пациента на 10 000 человек в популяции [1,2,3].

Заболевание названо по имени финского врача Эрика фон Виллебранда (E. vonWillebrand), который в 1926 г. опубликовал первое сообщение о необычном геморрагическом заболевании у девочки из многодетной семьи, проживающей на Аландских островах, которую он впервые консультировал в 1924 г. Это была 5-летняя девочка по имени Njordis, девятая из 11 детей в семье, у 7 из которых также имелись симптомы повышенной кровоточивости. Четыре родные сестры девочки умерли в раннем возрасте от неконтро-

Abstract. The lecture summarizes current data on the pathogenesis of one of the most common forms of congenital hemorrhagic diathesis – von Willebrand disease; presents clinical and laboratory characteristics of the three main types of the disease and diagnostic possibilities for their separation. The lecture is intended for hematologists, doctors of clinical and laboratory diagnostics, students of advanced training courses, clinical residents and general practitioners.

Keywords. Von Willebrand disease, von Willebrand factor, hemostatic disorder, diagnosis.

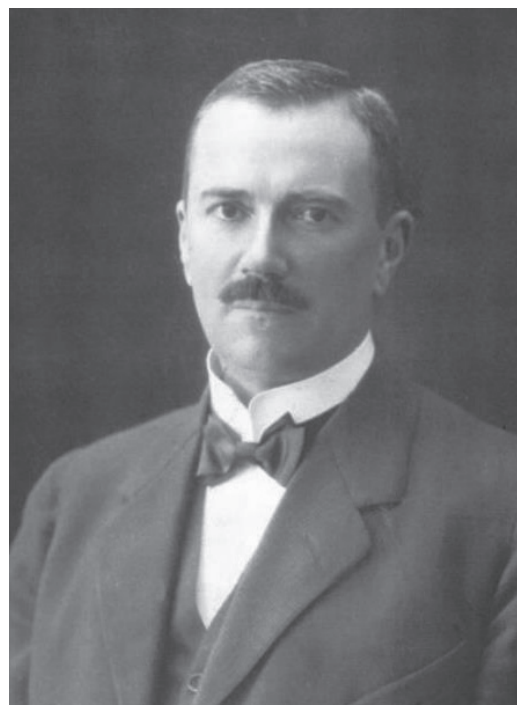


Рисунок 1. Эрик фон Виллебранд

лируемых кровотечений. Со слов родителей в семье были родственники и мужчины и женщины с геморрагическими проявлениями (рис. 2).

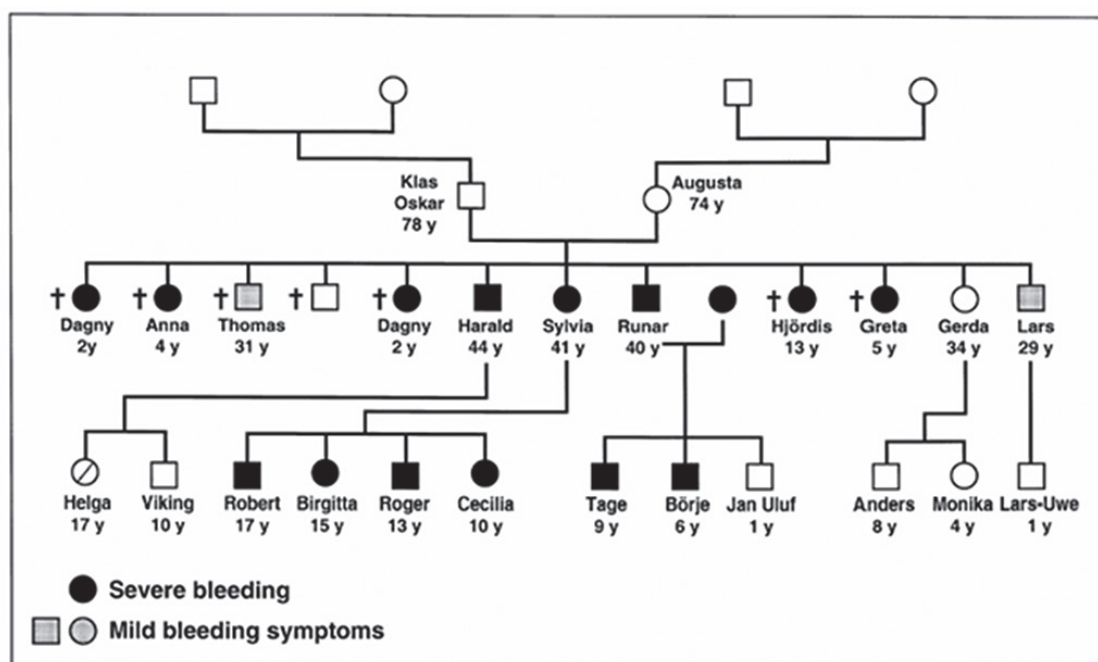


Fig. 1. Family S, Föglö.

Рисунок 2. Первая родословная семьи с болезнью Виллебранда (E. vonWillebrand, 1926)

У самой Hjördis были тяжелые эпизоды кровотечений из носа, губ, после экстракции зубов, а также кровоизлияние в голеностопный сустав. В возрасте 3 лет она кровоточила 3 дня из глубокой раны верхней губы. Кровотечение было столь тяжелым, что потребовалась длительная госпитализация. При обследовании, кроме легкой анемии (Hb 108 г/л) и небольшой тромбоцитопении ($140 \times 10^9/\text{л}$) ее анализ крови был в норме. Время свертывания крови и ретракция сгустка также были в норме, но при этом время кровотечения по Duke по продолжительности превышало 2 часа. Тест жгута, используемый для оценки сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, был высоко положительным. В возрасте 13 лет девочка умерла от обильного менструального кровотечения. Заинтригованный этим новым ранее не описанным заболеванием Эрик фон Виллебранда предпринял дальнейшее исследование с определением характера наследования и клинических проявлений этого необычного геморрагического состояния. Из составленной им родословной было обнаружено, что 23 из 66 членов семьи имели геморрагические проблемы. Наиболее частыми проявлениями заболевания были кровотечения из слизистых: носовые кровотечения, далее по частоте шли профузные кровотечения из ротовой полости, легкое возникновение синяков, у женщин обильные месячные и кровотечения в

родах. Кишечные кровотечения были причиной смерти некоторых членов семьи. В соответствии с описанием геморрагического статуса семьи Эрик фон Виллебранд сделал заключение, что это состояние является ранее неизвестной формой гемофилии, но поражающей оба пола и характеризующейся значительным удлинением времени кровотечения, и назвал его наследственной псевдогемофилией.

Этиопатогенез. Геморрагический синдром у пациентов с БВ обусловлен недостаточностью или функциональной неполноценностью фактора Виллебранда (фВ) [5,6,7,8]. Это в своем роде уникальный фактор, который в гемостазе выполняет двоякую функцию (рис 3).

Наиболее существенной функцией фВ является его участие в сосудисто-тромбоцитарном гемостазе, а именно в реакциях взаимодействия тромбоцитов с поврежденной сосудистой стенкой на стадиях адгезии, распластывания и агрегации тромбоцитов. В реакциях сосудисто-тромбоцитарного взаимодействия фВ выполняет роль моста между субэндотелиальными структурами поврежденной сосудистой стенки и тромбоцитами, а также между отдельными тромбоцитами, благодаря наличию в его структуре специфических доменов связывания (рис. 4).

Роль фактора Виллебранда в гемостазе

#1 соединяет тромбоциты через Gp1b с субэндотелием

#2 стабилизирует FVIII, доставляя его в зону повреждения

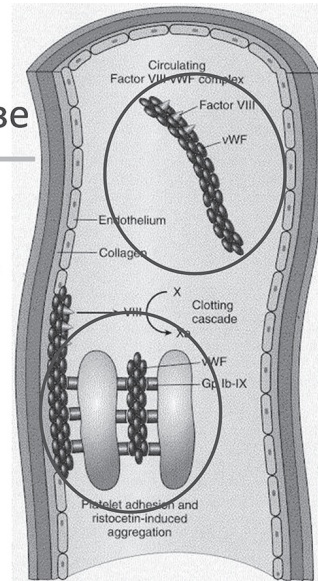


Рисунок 3. Роль фактора Виллебранда в осуществлении гемостаза.

Наряду с участием в реакциях сосудисто-тромбоцитарного взаимодействия, фВ необходим и для осуществления процесса свертывания крови. Будучи белком-носителем для коагуляционного фактора VIII (фVIII), он обеспечивает ему стабильность в циркуляции. Этой способностью к ассоциации с фVIII обладают лишь 10% циркулирующих мультимеров фВ [9]. Остальные 90% свободны от фактора VIII. Уменьшение количества фВ или нарушение его способности к связыванию с данным прокоагулянтом сопровождается снижением активности фVIII и соответственно нарушением образования теназного комплекса, состоящего из факторов VIII и IX, необходимого для осуществления нормального коагуляционного процесса.

В плазме здорового человека фВ представлен мультимерами различной молекулярной массы – от 500 тыс. до 20 млн. дальтон. Размер мультимеров регулируется металлопротеиназой ADAMTS-13. Каждый мультимер фВ состоит из многократно повторяющихся одинаковых субъединиц, имеющих 4 различных типа доменов, на которых локализованы специфические места связывания, обеспечивающие взаимодействие фВ с рецепторами тромбоцитарной мембраны - гликопротеином (ГП) Ib на стадиях адгезии и распластывания, с ГП IIb/IIIa на стадии агрегации, с субэндотелиальными структурами сосудистой стенки - коллагеном, гепарином, а также с фVIII (рис.4) [5,6,9].

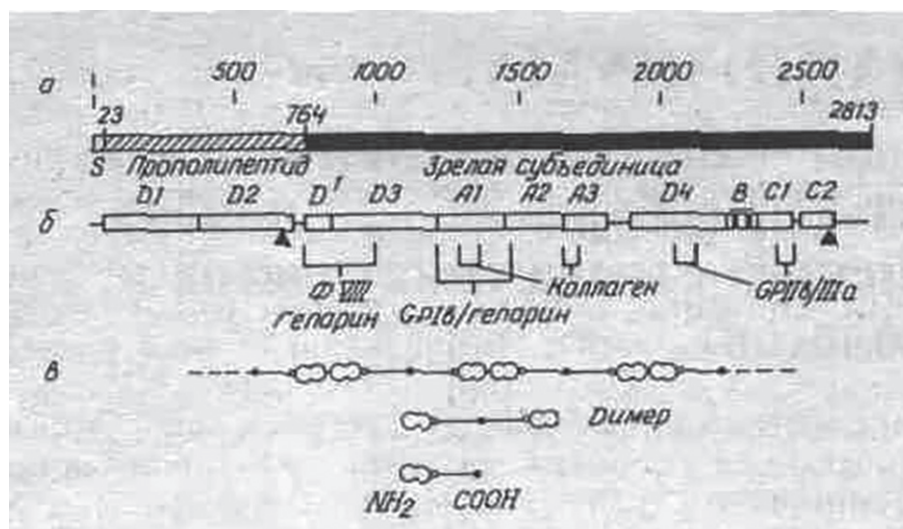


Рисунок 4. Структура фактора Виллебранда: а – предшественник фВ, включающий сигнальный пептид (S; аминокислоты 1–22), прополипептид (23–763) и зрелую субъединицу (764–2813); б – структурные и функциональные домены субъединицы фВ; в – модель мультимера фВ человека (цит А.Н. Мамаев [5]).

Таблица 1. Исследуемые параметры фактора Виллебранда [10]

Аббревиатура	Обозначение
vWF:RCo	Ристоцетин-кофакторная активность фВ
vWF:Ag	Антиген фВ
vWF:FVIII	Связывание фВ с фVIII
vWF:CB	Коллаген-связывающая активность фВ
vWF:PB assay	Связывание фВ с тромбоцитами
Мультимерный анализ фактора Виллебранда	

Аутентичный ген фВ (178 кб) локализован на коротком плече 12-й хромосомы, а псевдоген (98 % гомологии с геном фВ) – на хромосоме 22 [6,9].

Синтез фВ осуществляется в двух независимых клетках: мегакариоцитах и эндотелиальных клетках, инициируется в эндоплазматическом ретикулуме в виде пре-про-фВ молекул. После отделения сигнального пептида субъединицы связываются посредством дисульфидных связей, образуя про-фВ-димеры. Мультимеры формируются уже в комплексе Гольджи путем образования добавочных дисульфидных связей между про-фВ-димерами. Превращение про-фВ в зрелую форму осуществляется посредством ферментативного расщепления парных аминокислот под действием фурина, который отщепляет фВ:ArII от зрелой формы фВ. Обе формы хранятся в секреторных гранулах [6]. Основная порция фВ, синтезируемая в эндотелиальных клетках, с постоянной скоростью поступает в кровь, где образует комплекс с прокоагулянтом – фактором VIII. Часть синтезируемого в эндотелиальных клетках фВ поступает в субэндотелиальный матрикс, обеспечивая оптимальные условия для взаимодействия тромбоцитов с зоной поврежденного сосуда. И, наконец, еще одна порция белка остается в самой эндотелиальной клетке, как бы про запас, в специальных гранулах хранения тельцах Вейбеля-Паладе. ФВ, синтезируемый в мегакариоцитах, поступает в тромбоциты и хранится в α -гранулах [5, 6, 8].

Следует отметить, что в гранулах хранения тромбоцитов и эндотелиальных клеток в основ-

ном сосредоточены самые большие молекулы фВ, которые соответственно имеют максимальное число мест связывания и наиболее активны в биологическом плане. Секреция фВ из гранул хранения происходит в ответ на определенные стимулы, к которым относятся тромбин, ионофоры кальция, адреналин и некоторые лекарственные препараты типа DDAVP (синтетический аналог вазопрессина).

Основной причиной развития БВ считают различные количественные или качественные нарушения плазменного фВ, в то время как тромбоцитарный фВ оказывает влияние лишь на тяжесть клинико-лабораторных проявлений заболевания. В зависимости от характера нарушения плазменного фВ различают 3 основных типа заболевания [7]: тип 1 - частичный количественный дефицит фВ, наиболее частый, встречается у 3/4 больных; тип 3 – полный количественный дефицит фВ, относительно редкий. И, наконец, тип 2, который подразделяют на 4 подтипа (2A, 2B, 2M и 2N) с различными качественными нарушениями фВ. Из них наиболее частым является подтип 2A, при котором в плазме больных отсутствуют высокомолекулярные мультимеры фВ. Повышенная аффинность к тромбоцитарному рецептору GPIIb определяет подтип 2B БВ, снижение функциональной активности тромбоцитов без нарушения мультимерной структуры фВ характерна для подтипа 2M БВ и, наконец, сниженная аффинность к фVIII – подтип 2N БВ (табл. 2,3).

Таблица 2. Основные типы болезни Виллебранда

Тип	Характер нарушения фактора Виллебранда
1	Количественный дефект фВ
2	Качественный дефект фВ
3	Полное отсутствие фВ

Описание подтипов болезни Виллебранда представлено в работе Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC et al. в 2006 году. [7].

Наряду с перечисленными в таблице 2 основ-

ными типами БВ выделяют тромбоцитарный тип БВ (псевдо БВ) и приобретенный синдром Виллебранда, о которых следует помнить при проведении дифференциального диагноза.

Таблица 3. Характеристика различных типов болезни Виллебранда

Тип заболевания	Наследование	Характеристика
1	Аутосомно-доминантное	Недостаточная продукция фВ: количество фВ снижено, но структура мультимера и функция каждой молекулы сохранены. Уровень фVIII снижен пропорционально степени снижения фВ. Снижение количества фВ в плазме приводит к ослаблению его функциональной активности из-за отсутствия возможности образовывать достаточное количество связей с тромбоцитами, сосудистой стенкой и фVIII. В результате образуется слабая тромбоцитарная пробка, не способная обеспечить гемостаз в сосудах микроциркуляции. Без фВ увеличивается протеолиз фVIII, что нарушает формирование фибринового сгустка.
2		Качественный дефект фВ: качественные дефекты фВ, которые у большинства пациентов выражаются в непропорциональном снижении его функциональных свойств vWF:RCo (vWF:CB) или vWF:FVIII по отношению к количеству vWF, определяемому по уровню антигена (vWF:Ag).
Тип 2 БВ. Подтипы		
2 А	Аутосомно-доминантное (или рецессивное)	Изолированный дефицит высокомолекулярных мультимеров фВ. Снижена адгезия тромбоцитов, зависящая от фВ. Качественный дефект фВ обусловлен повышенной чувствительностью фВ к металлопротеиназе ADAMTS-13, которая расщепляет высокомолекулярные мультимеры фВ, а также с дефектами сборки мультимеров фВ вследствие нарушения димеризации
2 В	Аутосомно-доминантное	Повышена аффинность фВ к рецепторам GPIb тромбоцитов, избыточное связывание крупных мультимеров фВ с тромбоцитами. В результате они быстрее подвергаются расщеплению под действием металлопротеиназы ADAMTS-13, количество крупных мультимеров в плазме уменьшается. Тип 2В БВ характеризуется повышенной ристоцетин-индуцированной агрегацией тромбоцитов (ristocetin-induced platelet aggregation – RIPA) под действием низких концентраций ристоцетина. У пациентов часто отмечается тромбоцитопения различной степени выраженности, которая может усиливаться при стрессе или под действием DDAVP.
2 М	Аутосомно-доминантное (или рецессивное)	Снижена ристоцетин-кофакторная активность фВ при нормальном содержании и нормальной мультимерной структуре фВ. Данный подтип БВ включает различные варианты качественного дефекта фВ, в результате которых происходит нарушение связывания фВ с тромбоцитами или субэндотелием. Нарушение связывания с тромбоцитами снижает доступность мультимеров фВ для расщепления металлопротеиназой ADAMTS-13. В связи с этим распределение мультимеров фВ по молекулярной массе сохраняется без изменений после их секреции эндотелиальными клетками. У большинства больных типа 2М БВ наблюдается непропорционально низкая vWF:RCo активность относительно vWF:Ag.
2 N	Аутосомно-рецессивное	Нарушено связывание фВ с фактором VIII У пациентов БВ типа 2N имеется дефект фВ в месте связывания с фVIII. В результате не образуется комплекс vWF–FVIII. У многих пациентов с данным вариантом БВ ранее диагностировали гемофилию А легкой или умеренной степени тяжести (FVIII: C в пределах 5–22%). У пациентов с БВ типа 2N при введении высокоочищенных концентратов фVIII наблюдается практически нормальное повышение активности фVIII, однако время его полужизни снижено.
3	Аутосомно-рецессивное	Наиболее тяжелая форма болезни, при которой фВ практически полностью отсутствует. Поскольку одной из функций фВ является связывание с фVIII и его защита от протеолиза, для пациентов с типом 3 БВ характерно не только отсутствие фВ, но и очень низкая активность фVIII.

Клинические признаки. Первые симптомы БВ обычно появляются в детском возрасте – от 1 года до 5 лет. В подростковом возрасте, несмотря на преобладание аутосомно-доминантного характера наследования, заболевание чаще всего диагностируется у девочек в связи с обильными менструациями.

Наличие двойного дефекта в системе гемостаза в виде ослабления реакций сосудисто-тромбоцитарного взаимодействия и снижения активно-

сти фVIII, обусловленного количественными и/или качественными нарушениями фВ, определяет особенности кровоточивости при БВ, которые сходны как с тромбоцитопатией, так и с гемофилией. У больных преобладают подкожные геморрагии и кровотечения из слизистых. Кровоизлияния в суставы – редкое осложнение и в основном наблюдается у пациентов с низким уровнем фVIII. После травм и хирургических вмешательств у больных БВ кровоточивость обычно развивает-

ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

ся сразу из-за несостоятельности первичного гемостаза (образования тромбоцитарной пробки). Это отличает их от пациентов, страдающих гемофилией, для которых характерно отсроченное до нескольких часов от момента травмы развитие кровотечения вследствие замедленного образования фибрина и соответственно несостоятельности окончательной гемостатической пробки.

Наиболее часто встречающиеся клинические симптомы у лиц, которым впоследствии был поставлен диагноз БВ, обобщены в таблице 4 [11]. Как видно из таблицы, обычно это кровотечения из слизистых оболочек и кровоизлияния в кожу. В большинстве случаев кровотечение имеет легкую или умеренную степень тяжести (кровотечение, которое не требует переливания крови и, как правило, не требует посещения врача), что отражает преобладание типа 1 БВ. Однако опасные для жизни кровотечения (ЦНС, желудочно-кишечный тракт) могут возникать у лиц с типом 3 БВ, у некоторых с типом 2 БВ и редко у лиц с типом 1 БВ. Необычные проявления кровотечения, такие как гемартроз, чаще встречаются у людей с тяжелым дефицитом фВ и сопутствующим сни-

жением активности фVIII, преимущественно с типом 3 БВ.

Течение заболевания характеризуется периодичностью: кровоточивость сменяется ремиссиями различной продолжительности. Тяжесть клинических проявлений значительно варьирует даже среди членов одной семьи. Возможно, и малосимптомное течение БВ (редкие носовые кровотечения), когда болезнь часто остается нераспознанной. Исчезновение клинических и лабораторных признаков БВ наблюдается у некоторых женщин во время беременности, преимущественно с типом 1 БВ. Однако после родов все симптомы болезни вновь появляются.

На клинические симптомы заболевания может влиять и лекарственная терапия. Например, прием аспирина или НПВП, снижающих функциональную активность тромбоцитов, как правило, усугубляет тенденцию к кровотечению, в то время как прием оральных контрацептивов может уменьшить кровотечение у женщин, у которых есть БВ.

Таблица 4. Частота наиболее распространенных симптомов кровоточивости у здоровых и больных болезнью Виллебранда, % [11]

Симптомы кровоточивости	Здоровые n=989	Все типы БВ n =1 885	Тип 1 БВ n=713	Тип 2 БВ n =497	Тип 3 БВ n =451
Носовые	4,6-22,7	38,1-62,5	53-61	63	66-77
После удаления зуба	4,8-41,9	28,6-51,5	17-31	39	53-70
Меноррагии	23-68,4	47-60	32	39	53-70
Экхимозы	11,8-50	49,2-50,4	50	Нет данных	Нет данных
После небольших порезов, ссадин	0,2-33,3	36	36	40	50
Из десен	7,4-47,1	26,1-34,8	29-31	35	56
Послеоперационные	1,4-28,2	19,5-28	20-47	23	41
Гемартрозы	0-14,9	6,3-8,3	2-3	4	37-45
Желудочно-кишечные	0,6-27,7	14	5	8	20

Физический осмотр. Физическое обследование должно быть направлено на подтверждение признаков кровотечения, включая размер, расположение и распределение экхимозов, гематом, петехий и других признаков недавнего кровотечения. Обследование также должно быть сосредоточено на результатах, которые могут указывать на другие причины повышенного кровотечения, такие как признаки заболевания печени (например, желтуха), спленомегалия, артропатия, слабость суставов и кожи (например, синдром Элерса-Данлоса), телеангиэктазии (например, наследственная геморрагическая телеангиэкта-

зия), признаки анемии или анатомические повреждения при гинекологическом осмотре.

Диагностика

Диагностика болезни Виллебранда базируется на трех основных моментах, которые включают: 1) типичные симптомы кровоточивости, 2) семейный анамнез (характер наследования) и 3) особенности нарушения фВ.

Несмотря на кажущуюся простоту, заподозрить БВ на основании клинической оценки проявлений кровоточивости является сложной задачей, поскольку легкие симптомы кровотечения очень распространены и в здоровой популяции

(таблица 4). Нередко здоровые лица идентифицируют себя как имеющие специфические проявления кровоточивости так же часто, как и лица, имеющие БВ, особенно тип 1 БВ. Некоторые из наиболее важных клинических проблем при БВ конкретно относятся к женщинам. В данном случае речь идет о меноррагии. Действительно у женщин с установленным диагнозом БВ меноррагии встречаются достаточно часто. Тем не менее, данное проявление с одинаковой частотой встречается и у здоровых лиц контрольной группы и женщин с БВ. Наиболее информативными для клинической характеристики пациентов, у которых подозревается БВ, являются сведения о длительном кровотечении после операции, в том числе после удаления зубов. Наличие в анамнезе гематом или кровоизлияния в сустав также может быть полезным, когда оно связано с вышеуказанными симптомами.

Важно помнить, что при опросе больного, у которого подозревается БВ, не следует ориентироваться только на одном изолированном сим-

птоме кровотечения. При жалобе больного, например, только на частые кровотечения из десен, или обильные менструальные кровопотери, равно как на кровотечение после родов или носовое кровотечение при отсутствии других симптомов, диагноз БВ представляется сомнительным.

Ценной информацией для подтверждения диагноза БВ являются сведения о наличии в семье больного родственников, страдающих проявлениями кровоточивости, хотя такая история часто отсутствует у людей с легкими формами заболевания. В таких случаях сведения о клинических проявлениях кровоточивости у родственников менее информативны, чем результаты их лабораторного исследования, позволяющие выявить наибольшее число характерных для БВ нарушений гемостаза в данной конкретной семье.

В таблице 5 перечислены обязательные вопросы, которые следует использовать для выявления лиц, нуждающихся в дальнейшей лабораторной диагностике БВ [11].

Таблица 5. Обязательные вопросы для скрининга геморрагического заболевания

1.	Есть ли у вас кровный родственник, страдающий нарушением свертываемости крови, таким как болезнь Виллебранда или гемофилия?
2.	Было ли у вас когда-нибудь длительное кровотечение из обычных ран, длящееся более 15 минут или спонтанно повторяющееся в течение 7 дней?
3.	Было ли у вас когда-нибудь обильное, длительное или рецидивирующее кровотечение после хирургических процедур, таких как тонзилэктомия?
4.	Были ли у вас когда-нибудь синяки без видимой травмы или после минимальной травмы, особенно если вы почувствовали припухлость под синяком?
5.	Было ли у вас когда-нибудь спонтанное кровотечение из носа, на остановку которого потребовалось более 10 минут, пришлось ли вам обратиться за медицинской помощью?
6.	Были ли у вас когда-нибудь тяжелые, длительные или рецидивирующие кровотечения после удаления зубов, которые требовали медицинской помощи?
7.	Была ли у вас когда-нибудь кровь в кале, необъяснимая специфическим анатомическим поражением (таким как язва желудка или полип в толстой кишке)?
8.	Для женщин: были ли когда-нибудь обильные менструации, характеризующиеся наличием сгустков более дюйма (2,54 см) в диаметре и/или сменой прокладки или тампона чаще, чем ежечасно, или приводящие к анемии или низкому уровню железа?

Другим не менее важным критерием диагностики БВ являются данные о характере наследования и результаты лабораторного обследования больного.

Не следует забывать, что БВ передается как аутомный признак, соответственно в семье могут быть больные обоего пола. Ярким примером характера наследования служит родословная первой семьи с БВ, описанная Э. фон Виллебрандом.

Особенно важной является правильно выбранная стратегия лабораторной диагностики БВ, которая складывается из нескольких этапов.

1. На первом этапе проводится оценка основ-

ных скрининговых показателей, характеризующих состояние системы гемостаза, чтобы не пропустить другие возможные варианты геморрагических заболеваний:

- клинический анализ крови с подсчетом числа тромбоцитов в крови,
- время кровотечения (считается малоинформативным),
- протромбиновый тест по Квику - оценивает участие факторов VII, V и X в коагуляционном процессе,
- активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) - оценивает участие

ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

факторов XII, XI, IX, VIII в коагуляционном процессе.

У больных, страдающих БВ, с наибольшей частотой встречается увеличение АЧТВ из-за характерного для этого заболевания снижения активности фVIII. Клинический анализ крови и число тромбоцитов обычно в норме. Тромбоцитопения может быть у пациентов с типом 2 БВ. Время кровотечения, хотя и считается малоинформативным тестом для выявления БВ, у некоторых больных может быть увеличено, особенно у пациентов с типом 3 БВ.

2. Следующий этап лабораторной диагностики БВ заключается в выполнении тестов, идентифицирующих нарушение фактора Виллебранда:

- определение количества фВ в плазме (VWF:Ag),

- исследование ристоцетин-кофакторной активности фВ (VWF:RCo),

- определение коагуляционной активности фVIII, поскольку его стабильность в циркуляции зависит от фВ.

3. Тесты, идентифицирующие подтипы БВ:

- определение мультимерной структуры фВ,

- определение ристоцетин-индуцированной агрегации тромбоцитов (ristocetin-induced platelet agglutination – RIPA) для дифференциации подтипа, при котором фВ имеет повышенную чувствительность к ристоцетину (тип 2B), от других типов со сниженной чувствительностью,

- коллаген-связывающая активность фВ (VWF:CB). Этот тест определяет связывание фВ с коллагеном и характеризует функциональную активность фВ, как и VWF:RCo, - тест связывания фВ с фVIII, измеряет способность фВ присоединять фVIII (VWF:FVIII).

Диагностировать БВ не сложно только при тяжелом течении, когда у больных выявляются все клинико-лабораторные признаки заболевания, при этом активность фВ не превышает 30%. Но если клиника геморрагического синдрома выражена умеренно, то те или иные симптомы, типичные для БВ, могут не определяться. Это обычно легкие формы заболевания с умеренным снижением активности фВ, которые трудно дифференцировать от нормы. В таблице 6 представлены ожидаемые лабораторные показатели, характеризующие основные типы БВ.

Таблица 6. Ожидаемые лабораторные значения при болезни Виллебранда

Тестируемые параметры	Нормальные показатели здорового человека	Типы болезни Виллебранда					
		Тип 1	Тип 2A	Тип 2B	Тип 2M	Тип 2 N	Тип 3
VWF:Ag	N	L, ↓ или ↓↓	N или L	↓ или L	N или L	N или L	отсутствует
VWF:RCo	N	L, ↓ или ↓↓	↓↓ или ↓↓↓	↓↓	↓↓	N или L	отсутствует
FVIII	N	N или ↓	N или ↓	N или ↓	N или ↓	↓↓	1-9 IU/dL
RIPA	N	часто N	↓	часто N	↓	N	отсутствует
LD-RIPA	отсутствует	отсутствует	отсутствует	↑↑↑	отсутствует	отсутствует	отсутствует
PFA-100® CT	N	N или ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑
Время кровотечения	N	N или ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑
Число тромбоцитов	N	N	N	↓ или N	N	N	N
Структура мультимеров фактора Виллебранда	N	N	Нарушена (дефицит BM мультимеров)	Нарушена (дефицит BM мультимеров)	N	N	отсутствуют

Данные обозначения представляют типичные случаи болезни Виллебранда. На практике лабораторные исследования пациентов могут отклоняться от ожидаемых значений.

L, 30-50 IU/dL; ↓, ↓↓, ↓↓↓ – относительное уменьшение; ↑, ↑↑, ↑↑↑ – относительное повышение; FVIII – активность фактора VIII;

LD-RIPA – ристоцетин-индуцированная агрегация тромбоцитов с малыми дозами ристоцетина (концентрация ристоцетина ≤ 0,6 мг/мл);

N – норма; PFA-100® CT – анализатор функции тромбоцитов по времени закрытия микроотверстия в мембране;

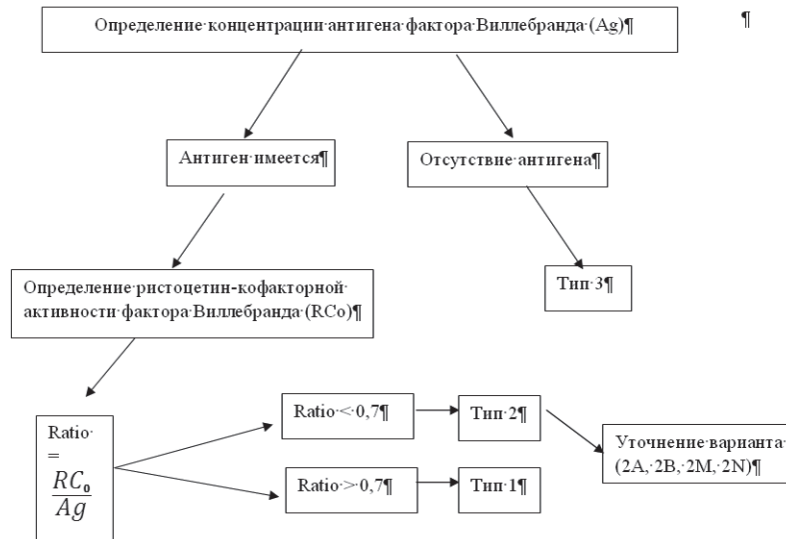
RIPA – ристоцетин-индуцированная агрегация тромбоцитов; BM – высокомолекулярные (мультимеры);

VWF:Ag – Антиген фактора Виллебранда; VWF:RCo – Ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда.

Поскольку отдельные методы для диагностики болезни Виллебранда имеют не одинаковую чувствительность и специфичность при различных типах этого заболевания предлагается ис-

пользовать диагностический алгоритм, составленный из тестов, идентифицирующих основные нарушения фВ (рис. 5).

Рисунок 5. Алгоритм лабораторной диагностики болезни Виллебранда, цит А.Н. Мамаев [5]



Вариабельность клиничко-лабораторных проявлений БВ может быть обусловлена рядом дополнительных экзогенных и эндогенных влияний, которые как повышают уровень фВ, так и снижают его.

Например, у лиц с группой крови O (I) уровень фВ снижен примерно на 30% по сравнению с лицами, имеющими группу крови A(II), B(III) или AB (IV) (табл.7).

Значительное повышение уровня фВ, преимущественно у лиц с типом 1 БВ, вызывают стрессовые ситуации, сопровождающиеся у детей криком и плачем, болевым синдромом, а также недавнее

оперативное вмешательство и инфекции. Характерное для данных ситуаций повышение уровня адреналина в крови стимулирует секрецию нормального в функциональном плане фВ из гранул хранения, что проявляется повышением активности и содержания фВ, а также активности фVIII иногда до нормальных значений. Этот факт следует учитывать при обследовании детей с подозрением на БВ. У лиц с типом 3 БВ такого эффекта практически не наблюдается, из-за полного дефицита фВ. Не следует проводить диагностику БВ также вскоре после заместительной терапии препаратами крови [11].

Таблица 7

Содержание фВ (%) в плазме в зависимости от групповой принадлежности крови

Группа крови	O (I) (n=456)	A(II) (n=340)	B (III) (n=196)	AB (IV) (n=109)
Содержание фВ (%)	74.8 (35.6-157.0)	105.9 (48.0-233.9)	116.9 (56.8-241.6)	123.3 (63.8-238.2)

N содержание фВ в плазме без учета группы крови 50 – 150%

The Diagnosis, Evaluation, and Management of von Willebrand Disease NIH Publication No. 08-5832 December 2007 [11].

На уровень фВ влияют гормональные колебания. Он повышается во время беременности и варьирует во время менструации, снижаясь на 5-7 день менструального цикла. Прием гормональных противозачаточных препаратов повышает уровень фВ и фVIII в крови женщин с БВ. Поэтому за три-четыре недели до обследования женщины должны прекратить прием гормональных препаратов. В случаях, когда анамнестические сведения позволяют предположить наличие БВ, но лабораторные данные сомнительные, необходимо проводить повторные исследования больных, предпочтительно в период повышенной кровоточивости, не связанной с лекарственной терапией. Обследование кровных родственников больного, имеющих геморрагические проявления, также важно, поскольку позволяет выявить максимальное число характерных признаков заболевания.

Дифференциальный диагноз

Наследственную форму БВ, прежде всего, следует дифференцировать от приобретенного синдрома Виллебранда, описанного при лимфопатии, системной красной волчанке, коллагенозах, а также при ДВС-синдроме, амилоидозе, при острых отравлениях пестицидом. Для больных с синдромом Виллебранда характерно отсутствие семейного анамнеза геморрагического диатеза и нормальные показатели гемостаза до развития кровотечений. Клиническое начало симптомов кровоточивости всегда неожиданное и сопровождается развитием характерных для БВ нарушений в системе гемостаза. Причиной их в большинстве случаев является появление ингибиторов фВ или качественная аномалия фВ, связанная со значительной абсорбцией высокомолекулярных мультимеров фВ патологическими белками [12,13]

От тромбоцитопенической пурпуры БВ отличаются наследственная отягощенность, нормальное число тромбоцитов, от врожденной тромбоцитопатии – нормальные показатели ретракции кровяного сгустка и агрегации тромбоцитов под влиянием АДФ, коллагена, адреналина, от гемофилии А – аутосомно-доминантный (рецессивный) характер наследования, увеличение времени кровотечения, снижение агрегации тромбоцитов под действием ристоцетина, снижение активности и содержания в плазме фВ [1,2,5,8].

Принципы терапии. Лечение БВ сводится к остановке кровотечений. Небольшие геморрагии могут быть остановлены местными средствами (давящая повязка, тампоны с гемостатической губкой). При отрицательном эффекте от использования местных средств и при необходимости поддерживать нормальный гемостаз, особенно при серьезных геморрагических проявлениях, а также при проведении оперативного вмешательства следует ориентироваться на нормализацию

уровня факторов VIII и Виллебранда. Это может быть достигнуто стимуляцией эндогенного гемостаза десмопрессинем или введением концентратов, содержащих фВ и фVIII [5,14].

Десмопрессин. Препарат Десмопрессин (DDAVP, не зарегистрирован в РФ) дает положительный гемостатический эффект у всех пациентов с типом 1 БВ, у которых имеется частичный количественный дефект фВ, но без нарушения его структуры. Гемостаз в этом случае объясняется тем, что препарат DDAVP способствует выбросу из гранул хранения эндотелиальных клеток и тромбоцитов нормального в функциональном отношении фВ. Эффект фактически молниеносный, но максимальные значения достигаются примерно через час после внутривенного введения препарата. Если лечение необходимо продолжить, введение препарата следует повторять с интервалом 8-12 часов. Десмопрессин может применяться как парентерально (внутривенно или подкожно), так и назально. Интраназальный спрей удобен для домашнего лечения. Препарат эффективен не более 3 дней, что обусловлено необходимостью синтеза новой порции фВ. Этот препарат нет смысла назначать больным с типом 3 БВ, так как у них нет фВ ни в эндотелиальных клетках, ни в тромбоцитах. Не эффективен он и при типе 2 БВ, поскольку при этом варианте заболевания синтезируется качественно неполноценный белок. Увеличение концентрации такого фВ может быть просто опасным. Например, при подтипе 2В БВ, повышение уровня фВ, обладающего повышенной аффинностью к тромбоцитарному рецептору GPIIb, может вызвать осложнение в виде тромбоцитопении, что еще больше усугубит нарушение гемостаза и усилит геморрагический синдром.

Концентраты, содержащие комплекс FVIII/VWF:В случае массивных кровотечений и при подготовке больных БВ к хирургическим вмешательствам необходима заместительная терапия. Большинство препаратов, предлагаемых для заместительной терапии при БВ, содержат оба фактора: и фVIII и фВ. Концентрированные препараты фVIII не эффективны для лечения больных БВ, поскольку фVIII имеет очень короткий полупериод жизни при отсутствии фВ. Для лечения больных, страдающих БВ, используют также концентраты фВ, не содержащие фVIII. Инфузия чистых концентратов фВ стимулирует высвобождение эндогенного фVIII, который достигает максимального уровня примерно через 24 часа [14].

Для определения гемостатической дозы препарата необходимо руководствоваться характером кровотечения, а также показателями активности фVIII. При кровотечениях из слизистых, для остановки которых ведущую роль играет сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, следует руководствоваться показателями активности фВ. Эффек-

тивной дозой считается та, которая позволяет поддерживать активность фВ на гемостатическом уровне (40–60%). При гематомах, гемартрозах и перед оперативными вмешательствами, в том числе перед операцией по поводу экстракции зуба, наряду с коррекцией сосудисто-тромбоцитарного гемостаза необходимо корригировать и коагуляционный дефект, имеющийся у больного БВ. Так, если у больного снижена коагуляционная активность фVIII, то ее следует повысить и поддерживать на уровне, соответствующем тяжести кровотечения или оперативного вмешательства, как при гемофилии. Непосредственно после введения препаратов крови у больных БВ отмечается быстрое, но кратковременное (до 6–8 ч) повышение активности фVIII, за которым следует повторное, позднее (через 8–24 ч после трансфузии) и длительное до нескольких суток увеличение активности фVIII с постепенным снижением до исходного уровня.

Больным с типом 3 БВ при массивных кровотечениях наряду с концентратами, содержащими фВ и фVIII, рекомендуют вводить концентраты тромбоцитов.

В качестве дополнительных средств гемостатического действия при БВ используется транексамовая кислота – ингибитор фибринолиза, что позволяет уменьшить кровотечение из слизистых, в том числе и во время менструаций. В последнем случае положительный гемостатический эффект оказывают контрацептивы, содержащие эстроген.

При лечении пациентов, страдающих болезнью Виллебранда, следует ориентироваться на «Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда», утвержденные на IV Конгрессе гематологов России (апрель 2018). Коллектив авторов под руководством академика В.Г. Савченко Авторы: Зозуля Н.И., Кумскова М.А., Лихачева Е.А., Свириной П.В.

Профилактика. Для предупреждения кровотечений у лиц, страдающих БВ, необходимо максимально исключить травмирование, запретить прием препаратов, которые повышают тенденцию к кровоточивости, в том числе антикоагулянты (гепарин, варфарин), антиагреганты (аспирин, клопидогрель), НПВС. Для предупреждения кровотечений в родах все беременные, страдающие БВ, должны наблюдаться гематологом. Особого внимания требуют те из них, у которых во время беременности не происходит коррекции нарушенных показателей гемостаза. Как правило, у таких женщин в родах и раннем послеродовом периоде развиваются тяжелые кровотечения, которые можно предупредить введением препаратов, содержащих фВ.

Прогноз при БВ в большинстве случаев благоприятен, за исключением наиболее тяжелых форм (тип 3 БВ). С возрастом у больных с типом 1 и 2 БВ возможно спонтанное исчезновение клинических и лабораторных признаков заболевания, вплоть до исключения диагноза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С. Гемостаз. Раздел в кн: Руководство по гематологии / под ред. А.И. Воробьева, 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Ньюдиамед, 2005. - Т. 3. - С. 9 - 147.
2. Кузник Б.И., Стуров В.Г., Максимова О.Г. Геморрагические и тромботические заболевания и синдромы у детей: патогенез, клиника, диагностика, терапия и профилактика / Новосибирск: Наука, 2012. - 456 с.
3. Brown S.A., Collins P.W., Cumming A.M. et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization / Haemophilia. - 2004. - Vol. 10. - № 3. - P. 199 - 217. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2004.00894.x
4. Lassila R., Lindberg O. Erik von Willebrand / Haemophilia. - 2013. - Vol. 19. - P. 643 - 647. DOI: 10.1111/hae.12243.
5. Мамаев А.Н. Коагулопатии: руководство. - М.: ГЭОТАР – Медиа, 2012. - 264 с.: ил.
6. Шиффман Ф. Д. Патология физиологии крови: монография / Пер. с англ. - М.: «Издательство БИНОМ», 2016 - 448 с.: ил.
7. Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C. et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand factor / J Thromb Haemost. - 2006. - Vol. 4.-№10.-P. 2103 - 2114. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x
8. Папаян Л.П., Капустин С.И., Шмелева В.М., Кобилянская В.А. Раздел II, глава 8 в кн: Гематология: Национальное руководство / под ред. О.А. Рукавицына. - М.: ГЭОТАР – Медиа, 2015. - С. 89 -132.
9. Lenting P.J., Casari C., Christophe O.D. et al. Von Willebrand factor: the old, the new and the unknown / J Thromb Haemost. - 2012. - Vol. 10. - P. 2428 - 2437. DOI: 10.1111/jth.12008.
10. Mazurier C, Rodeghiero F. Recommended abbreviations for von Willebrand Factor and its activities. Thromb Haemost.- 2001.- Vol.86 - №2.-P.712.
11. The Diagnosis, Evaluation, and Management of von Willebrand Disease NIH Publication No. 08-5832 December 2007
12. Nitu - Whalley I.C., Lee C.A. Acquired von Willebrand syndrome - report of 10 cases and review of the literature / Haemophilia. - 1999. - Vol. 5. - P. 328 - 336. DOI: 10.1046/j.1365-2516.1999.00340.x
13. Vayradier A., Jenkins C.S.P., Fressinnaud E. et al. Acquired von Willebrand syndrome: from pathophysiology to management / Thromb Haemost. - 2000. - Vol. 84. - P. 175 - 182.
14. Летаген С. Гемостаз и геморрагические заболевания / Пер. с англ. - М.: Аир-Арт, 2004. - 82 с.

II НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»

Санкт-Петербург, 18–19 ноября 2021 г.

**И.А. Булдаков¹, С.В. Волошин¹, В.А. Шуваев^{1,2}, С.В. Петров¹, О.Д. Муштакова¹,
Л.С. Мартыненко¹, М.П. Бакай¹, Ю.С. Руженкова¹, Е.В. Клеина¹, Ю.С. Вокуева¹,
С.С. Бессмельцев¹, С.В. Сидоркевич¹, И.С. Мартынкевич¹**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница имени В.В. Вересаева» Департамента здравоохранения г. Москвы, г. Москва

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ФАЗОЙ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Введение. С каждым годом накапливается все больше данных о механизмах развития первичной и вторичной резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) у пациентов с ХМЛ. Технология секвенирования следующего поколения (NGS) позволяет обнаруживать мутации в киназном домене BCR-ABL химерного гена у значительной части пациентов с резистентностью к терапии ИТК. Но по-прежнему остаются неясными причины резистентности у пациентов без мутаций в киназном домене BCR-ABL.

Цель. Определить BCR-ABL-независимые молекулярно-генетические маркеры резистентности к терапии ИТК у пациентов с ХМЛ с применением NGS.

Материалы и методы. Мы исследовали образцы крови 15 пациентов с резистентным течением ХФ ХМЛ (8 мужчин и 7 женщин) в возрасте от 32 до 59 лет (Me=44 года). Резистентность к терапии ИТК определяли по критериям ELN 2013. 2 пациента получали терапию двумя ИТК, 8 пациентов – тремя ИТК, 3 пациента – 4 ИТК и 2 пациента получали – 5 ИТК (Me=3 ИТК). У 3 пациентов при цитогенетическом исследовании выявлялась дополнительная 8 хромосома. У 1 пациента однократно обнаружена мутация T315I. Пациентам было выполнено NGS исследование миелоидной панели, включающей 55 генов, со средней глубиной прочтения 1000x на приборе MiSeq (Illumina). При анализе полученных данных применялся 2% порог частоты встречаемости аллеля (VAF). Клиническая значимость мутаций устанавливалась по базам данных COSMIC, ClinVar и OMIM.

Результаты. Использование NGS позволило выявить генетические aberrации у всех исследуемых пациентов: в среднем по 5 мутаций (от 1 до 10 у одного больного). Всего было выявлено 77 мутаций с неясной клинической значимостью: из них 54 миссенс-мутации, 22 – синонимичных мутации и 1 вариант со сдвигом рамки считывания. Наиболее часто аномалии обнаруживались в генах NF1 (10), TET2 (8), ATRX (7) и STAG2 (6). У 2 пациентов обнаружено сочетание мутаций в генах ATRX и NF1, у них наблюдалось первично-резистентное течение заболевания, БМО не был достигнут даже на 3 и 4-й линиях таргетной терапии. У 3 пациентов выявлено одновременное наличие мутаций в генах NF1 и STAG2, у двух из них также отме-

чалось первично-резистентное течение заболевания и у одного из них зарегистрирована резистентность ко всем 5 ИТК. У 2 пациентов с одновременным наличием мутаций в генах ATRX и TET2 зарегистрирована резистентность к 2 ИТК, ПЦО без БМО достигнут только при применении Понатиниба. У 3 пациентов с одиночными мутациями в STAG2 БМО достигнут на третьей линии ИТК. У 1 пациента с 3 мутациями в TET2 БМО также достигнут только на третьей линии ИТК.

Мутации в TET2 довольно часто встречаются при Ph-негативных МПН. В нашем исследовании чаще других мутации выявлялись в генах NF1, ATRX и STAG2. Хотя мутации в генах NF1 и ATRX были описаны ранее у ответивших на лечение пациентов с ХФ ХМЛ. В нашем исследовании мутации в этих генах были обнаружены у резистентных к терапии пациентов с неблагоприятным течением заболевания. Ген NF1 кодирует активирующий ГТФазу белок (GAP, GTPase activating protein), который участвует в ингибировании RAS/MAPK пути передачи сигнала в клетку, и является супрессором опухолей. Мутации в данном гене часто ассоциированы с развитием ХММЛ и ЮММЛ, резистентностью к терапии и ухудшением общей выживаемости. Ген ATRX кодирует белок, участвующий в ремоделировании хроматина, регуляции транскрипции, репликации и поддержании структуры теломера. Ген STAG2 кодирует белок, входящий в состав когезинового комплекса.

Возможно, аномалии в данных генах могут принадлежать клону лейкемических стволовых клеток, обуславливать их резистентность к ИТК, BCR-ABL-независимый пролиферативный потенциал и их генетическую нестабильность. Это позволило нам предположить прогностическую и терапевтическую ценность мутаций в генах NF1, ATRX и STAG2 у пациентов с ХФ ХМЛ с резистентностью к терапии ИТК.

Выводы. Полученные результаты пилотного исследования применения NGS для прогнозирования BCR-ABL-независимой резистентности к терапии ИТК у пациентов с ХМЛ могут служить основой для дальнейших исследований с целью разработки прогностических моделей и выбора метода лечения при резистентности к таргетной терапии.

Габдулхакова А.Х., Минаева Н.В., Назарова Е.Л., Шерстнев Ф.С., Трегубова Е.В., Рыболовлева Т.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОЙ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК У ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Введение. Свободная циркулирующая ДНК (сцДНК) представляет собой двухцепочечные низкомолекулярные молекулы геномной ДНК различной протяженности, не связанные с клетками и определяющиеся практически во всех жидкостях организма: плазме, сыворотке, моче, слюне и спинномозговой жидкости. У здоровых людей концентрация сцДНК в крови колеблется от 0 до 100 нг/мл. При некоторых патологических и физиологических состояниях (злокачественные новообразования, воспалительные процессы, травматические повреждения, физическая нагрузка, введение лекарственных препаратов и т. п.) содержание свободных (внеклеточных) нуклеиновых кислот повышается. Одним из таких факторов может быть введение человеческого гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) донорам гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Открытие феномена нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) как особой сети, состоящей из сцДНК с интегрированным в нее содержимым гранул нейтрофилов, изменило существующие концепции иммунологии. Согласно литературным данным, Г-КСФ напрямую влияет на способность гранулоцитов высвобождать NET и стимулирует тромбообразование, что может оказывать влияние на систему кроветворения у доноров ГСК, приводить к появлению сцДНК в трансплантационном продукте и влиять на его характеристики.

Цель. Определить уровень общей свободной циркулирующей ДНК у доноров ГСК после стимуляции Г-КСФ.

Материалы и методы. Исследованы образцы пери-

ферической крови 42 доноров ГСК перед началом введения Г-КСФ и в день первого афереза клеток. Возраст обследованных колебался от 15 до 53 лет (медиана - 32,5 года). Из них 24 (57%) мужчины и 18 (43%) женщин. Выделение сцДНК проводили из сыворотки периферической крови с помощью комплекта реагентов «SileksMagNA-Direct» (ООО «Силекс», Россия) на магнитных частицах. Концентрацию сцДНК определяли с помощью набора для количественной и качественной оценки геномной ДНК человека «QuantumDNA» (ЗАО Евроген, Россия). Статистическую значимость различий количественных показателей оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Медиана концентрации сцДНК доноров до введения Г-КСФ составила 2 (диапазон колебаний: от 0 до 12) нг/мл. Медиана содержания сцДНК, выделенной из крови, взятой в день первого афереза определена на уровне 12,5 (пределы концентрации: 2 - 69) нг/мл. Выявлено статистически значимое различие, касающееся увеличения пула сцДНК у доноров ГСК, индуцированного введением Г-КСФ ($p < 0,001$).

Выводы. Показано, что мобилизация ГСК с помощью Г-КСФ сопряжена с ростом концентрации свободной внеклеточной ДНК у практически здоровых людей – доноров клеточного трансплантата. Данное исследование является пилотным и требует дальнейшей оценки определения содержания сцДНК в крови реципиентов Г-КСФ и клеточном трансплантате.

Гарифуллин А.Д.^{1,2}, Волошин С.В.^{1,3,4}, Мартынкевич И.С.¹, Бессмельцев С.С.¹, Бакай М.П.¹, Клеина Е.В.¹, Линников С.Ю.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

⁴Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Введение. Аутологичная трансплантация костного мозга/гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является стандартом лечения «молодых» и «сохранных» пациентов с множественной миеломой (ММ). Проведение этого варианта лечения несколько ограничено в ряде регионов вследствие высокого потребления эко-

номических ресурсов и доступности криобанка. Мы провели ретроспективный анализ пациентов с ММ, которым выполнялась аутологичная трансплантация с использованием некриоконсервированных ГСК.

Материалы и методы. Проведено сравнение показателей жизнеспособности ГСК и эффективности

аутоТГСК у 78 пациентов. Все пациенты получали стандартные программы терапии и находились в ремиссии. Режимом кондиционирования для проведения аутоТГСК выбрана стандартная терапия мелфаланом (MEL200). В зависимости от способа хранения ГСК пациенты соотнесены в группу не-КРИО – без криоконсервирования ($n = 35$), группу КРИО – с криоконсервированием ($n = 43$). Продукт афереза ГСК в группе не-КРИО хранился при температуре от $+4$ до $+6$ °C в присутствии многокомпонентного раствора антикоагулянта на основе цитрата натрия сроком до 3 суток. Для группы КРИО аферезный продукт криоконсервировали в присутствии диметилсульфоксида (ДМСО) и хранили при сверхнизких температурах в условиях криобанка. Жизнеспособность ГСК оценивалась дважды (после афереза и непосредственно перед реинфузией) по количеству CD34+ и 7AAD- клеток, а также колониобразующей способности (КОС) ГСК.

Результаты. Не было достоверных различий в количестве CD34+ клеток $\times 10^6/\text{кг}$, в уровне 7AAD- клеток, в показателях общей КОС. Однако, отмечена достоверная разница в проценте утраты CD34+ клеток от момента афереза до момента реинфузии, что вероятнее всего обусловлено воздействием факторов внешнего окружения. Типичные для инфузий криоконсервированных с ДМСО ГСК явления отсутствовали в группе не-КРИО. У 29 из 43 пациентов контрольной

группы КРИО (67,4%) при проведении реинфузии ГСК были отмечены реакции характерные для ДМСО Аналогичные проявления в группе не-КРИО закономерны полностью отсутствовали. У всех пациентов было констатировано полноценное восстановление кроветворения при выписке из стационара. Восстановление нейтрофилов было достигнуто на 11-й (диапазон 9-14) и тромбоцитов на 12-й день (диапазон 8-19) в группе не-КРИО, на 10-й (диапазон 8-14) и 12-й (диапазон 8-20) день в группе КРИО. Проведение трансплантации ГСК позволило увеличить количество полных ответов, МОБ-негативных ответов и уменьшить величину опухолевой нагрузки.

Выводы. Метод хранения ГСК без криоконсервирования не уступает традиционному методу с ДМСО. Безопасность АТГСК при ММ с применением некриоконсервированных ГСК подтверждается отсутствием побочных эффектов ДМСО, аналогичными сроками восстановления гемопоэза, низкой потребностью в заместительной гемокомпонентной терапии и частотой развития большинства посттрансплантационных осложнений. Применение некриоконсервированных ГСК делает аутотрансплантацию при ММ более доступной, в том числе, в лечебных учреждениях, не имеющих в своей структуре криобанка.

Гришина Ж.В., Ядгаров М.Я., Базанович С.А., Павлова А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр спортивной медицины и реабилитации Федерального медико-биологического агентства», г. Москва

РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ УРОВНЯ ГЕМОГЛОБИНА И СЫВОРОТОЧНОГО ЖЕЛЕЗА В КРОВИ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ СПОРТСМЕНОВ

Введение. Для достижения высоких спортивных результатов необходимо поддержание адекватной интенсивности аэробных физических нагрузок и высокого уровня кислородтранспортной функции крови. Для своевременного выявления отклонений в показателях кислородтранспортной системы крови и ранней диагностики анемических состояний у профессиональных спортсменов врачу важно ориентироваться на референтные интервалы (РИ) показателей крови, адаптированные для спортсменов, с учетом пола, возраста и спортивной специализации. По данным наблюдений, именно в рамках углубленного медицинского обследования (УМО) спортсменов сборных команд России впервые выявляются отклонения в обмене железа.

Цель. Рассчитать референтные интервалы показателей концентрации гемоглобина и содержания сывороточного железа на выборке профессиональных спортсменов разного пола и возраста.

Материалы и методы. Были обследованы спортсмены – члены спортивных Сборных команд России в возрасте от 16 до 38 лет шести групп видов спорта: циклических, скоростно-силовых, сложно-координационных, игровых и единоборств, включающих 40 спортивных дисциплин. Общее количество обследованных спортсменов – 5245, из них 3167 спортсменов мужского и 2078 женского пола. Спортивная квалификация обследованных спортсменов: 396 человек име-

ли различные спортивные разряды, 2178 являлись кандидатами в Мастера спорта (КМС), 2671 спортсмен имел квалификацию Мастер спорта (МС) и выше.

При расчете РИ анализируемых параметров крови были исключены результаты обследования спортсменов, не допущенных к учебно-тренировочному процессу по итогам прохождения УМО по состоянию здоровья. Исследования проводились на базе ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна и ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России. Параметры крови измерялись с помощью полуавтоматического биохимического анализатора BioSystems BTS-350. Взятие крови проводилось утром натощак.

С использованием критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лилиефорса и критерия Шапиро-Уилка, оценивался тип распределения данных. В дальнейшем проводилась элиминация статистических выбросов с использованием критерия Шовене и метода Тьюки. В случае соответствия данных нормальному закону распределения применялся стандартный подход к построению РИ на основе t-критерия Стьюдента, в противном случае доверительный интервал рассчитывался для логнормального распределения с расчётом коэффициента разности.

Результаты. В результате сравнительного анализа рассчитанных РИ концентрации гемоглобина у спортсменов разного возраста и пола с РИ, приняты-

ми в лечебно-профилактических учреждениях ФМБА России (общепопуляционные) для оценки состояния здоровья спортсменов во время проведения УМО (РИ ФМБА), были выявлены отличия как в ширине, так и в минимальных значениях РИ (у мужчин: min РИ ФМБА 132 г/л, min рассчитанных РИ 123,5 г/л; у женщин: min РИ ФМБА 120 г/л, min рассчитанных РИ 113 г/л). Минимальная ширина РИ содержания гемоглобина как у спортсменов мужского, так и женского пола наблюдается в возрастном диапазоне 14-15 лет (у мальчиков 125,62 – 165,07 г/л, у девочек 111,63 – 147,16 г/л). Минимальные значения РИ содержания железа в сыворотке крови у спортсменов обоих полов приходится на возраст 14-15 лет (у мальчиков 7,4 мкмоль/л по сравнению с 11,6 мкмоль/л РИ ФМБА, у девочек 5,9

мкмоль/л по сравнению с 9 мкмоль/л). С увеличением возраста спортсменов верхняя граница РИ содержания железа увеличивается как у спортсменов мужского, так и женского пола.

Выводы. Рассчитанные на многотысячной выборке спортсменов РИ концентрации гемоглобина и сывороточного железа отличаются от общепопуляционных РИ как по ширине, так и по минимальным и максимальным значениям. Применение данных адаптированных РИ показателей крови позволит врачам специалистом по спортивной медицине уже на ранних этапах идентифицировать анемические состояния и предпринять своевременно меры по коррекции выявляемых отклонений в состоянии здоровья спортсмена.

Гурьянова М.А., Шухов О.А., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Никифорова К.А., Челышева Е.Ю., Быкова А.В., Петрова А.Н., Немченко И.С., Гальцева И.В., Туркина А.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава Российской Федерации, г. Москва

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ CD26+ ЛЕЙКОЗНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Введение. Лейкозные стволовые клетки (ЛСК) при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) находятся в CD34+CD38-/Lin- фракции лейкозного клона. Зарубежными исследователями было выявлено, что у 100% пациентов с ХМЛ на ЛСК обнаруживается экспрессия CD26+, которая не выявляется на нормальных гемопоэтических стволовых клетках и лишь в единичных случаях обнаруживается на ЛСК при других гематологических заболеваниях. В течение последних лет зарубежными авторами активно исследуется роль CD26+ ЛСК в диагностике ХМЛ, в оценке минимальной остаточной болезни на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК), а также изучается значение CD26+ ЛСК в качестве прогностического маркера перед отменой терапии ИТК для длительности ремиссии без лечения (РБЛ).

Цель. Оценить концентрацию CD26+ ЛСК в периферической крови (ПК) и костном мозге (КМ) у пациентов в дебюте ХМЛ, на разных этапах терапии ИТК и определить взаимосвязь концентрации CD26+ ЛСК с достижением оптимального ответа на терапию ИТК.

Материалы и методы. CD26+ ЛСК в ПК и КМ выявлялись при помощи наборов моноклональных антител анти-CD26-PE, CD45-APC-Cy7, CD34-APC и CD38-FITC. Анализ проводился на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter). С августа 2020 по сентябрь 2021 года обследовано 169 пациентов. У пациентов с ХМЛ с длительностью терапии ИТК менее 12 месяцев (мес.) забор образцов (ПК/КМ) проводился в момент диагностики (n=40/24), через 3 мес. (n=25/7), 6 мес. (n=18/1), 9 мес. (n=5/0) и 12 мес. (n=11/1) терапии. У пациентов с длительностью терапии ИТК более 12 мес. и уровнем BCR-ABL >0,01% (n=14) забор ПК выполнялся однократно. Пациенты с ХМЛ с глубоким МО были разделены на 2 группы: пациенты, получающие терапию ИТК, и пациенты в РБЛ. В первой группе у пациентов выполнялся забор ПК (n=45) и КМ (n=18),

во второй группе – только ПК (n=24). В контрольную группу были включены пациенты с другими гематологическими заболеваниями (n=14): ПМФ (n=2), ОМЛ (n=2), Ph+ОМЛ (n=1), Ph+ОЛЛ (n=1), ХММЛ (n=4), МДС/МПЗ с гиперэозинофилией (n=1), ЭТ (n=1), ХМЛ с атипичными типами транскрипта BCR-ABL (n=2).

Результаты. CD26+ ЛСК в ПК и КМ были обнаружены у всех пациентов в дебюте ХМЛ. Медиана (абс.) (Me) CD26+ ЛСК в ПК составила 29,3/мкл (0-345,7), в КМ — 48,2/мкл (0,5-426,8). Через 3 мес. терапии CD26+ ЛСК были выявлены в КМ только у 1/6 пациента. На сроках терапии ИТК 6, 9 и 12 мес. ни у кого из пациентов CD26+ ЛСК не были выявлены ни в ПК, ни в КМ. В группе пациентов без глубокого МО с длительностью терапии ИТК >12 мес. CD26+ ЛСК были обнаружены у 4/6 (67%) пациентов с BCR-ABL >1% и резистентностью к нескольким линиям терапии ИТК. Me CD26+ ЛСК составила 0,12/мкл (0,05-0,2). У пациентов с ХМЛ с глубоким МО, как получавших терапию ИТК, так и в РБЛ, ни в ПК, ни в КМ не были обнаружены CD26+ ЛСК. В контрольной группе CD26+ ЛСК в ПК были выявлены у 5/14 (36%) пациентов со следующими заболеваниями: Ph+ ОЛЛ и ХМЛ с BCR-ABL p190, ПМФ, ХММЛ и МДС/МПЗ с гиперэозинофилией. Установлена прямая корреляция между концентрацией CD26+ ЛСК в ПК у больных ХМЛ в дебюте заболевания и числом лейкоцитов ($r=0.5588$, $p=0.0006$), а также между концентрацией CD26+ ЛСК в ПК и МО на терапии иматинибом через 3 мес. ($r=0.77$, $p<0.0001$). Me CD26+ ЛСК в группе пациентов с уровнем BCR-ABL <10% и BCR-ABL >10% через 3 мес. терапии составила 21,2/мкл (0,4 – 457) и 118,7/мкл (12,5 – 1029,4), соответственно ($p=0.04$).

Выводы. Подтверждено, что у 100% пациентов с ХМЛ в дебюте заболевания в ПК и в КМ, выявляются CD34+CD38-CD26+ ЛСК. Однако, по нашим данным, CD26+ ЛСК обнаруживаются в ПК у 36% пациентов и с другими гематологическими заболеваниями. Установ-

лено, что у пациентов на ранних сроках терапии ИТК, при определяемом уровне BCR-ABL, и у пациентов с глубоким МО с неопределяемым уровнем транскрипта, CD26+ ЛСК не детектируются, что противоречит результатам зарубежных исследований. Выявлено, что у пациентов с оптимальным ответом через 3 месяца терапии ИТК, концентрация CD26+ ЛСК в ПК в дебюте

заболевания была достоверно ниже, чем у пациентов без оптимального ответа на лечение ($p < 0.0001$). Планируется продолжение исследования динамики CD26+ ЛСК на фоне терапии ИТК и дальнейшее изучение роли CD26+ ЛСК в достижении оптимального ответа на лечение.

Загарских А.Н., Бутина Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

АССОЦИАЦИЯ HLA-ГЕНОВ С НЕЭФФЕКТИВНЫМИ ПОПЫТКАМИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Введение. Антигены лейкоцитов человека (HLA) - наиболее полиморфные локусы в человеческом геноме, которые относятся к генам иммунного ответа, определяя направление процессов, протекающих в системе иммунитета. Кроме участия генов HLA в предрасположенности к развитию иммуноопосредованных заболеваний, связанных с системой иммунитета (инфекционных, онкологических и аутоиммунных), их полиморфизм играет важную роль в гестационном процессе.

В последнее время при лечении бесплодия большие надежды возлагаются на использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в частности, экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Несмотря на эффективность этого метода, примерно у 30% супругов регистрируются повторные неэффективные циклы ЭКО. Кроме того, до настоящего времени не существует однозначного мнения относительно участия генов системы HLA в удачных или неудачных процедурах искусственного оплодотворения.

Цель. Изучить частоту встречаемости генов HLA класса II у женщин и мужчин из супружеских пар с неэффективными попытками экстракорпорального оплодотворения.

Материалы и методы. Типирование генов HLA класса II выполнено у 272 супружеских пар с неэффективными попытками ЭКО и инсеминациями спермой мужа (ИСМ). Главными условиями отбора супругов для исследования явились первичные или повторные имплантационные потери после применения ВРТ: 1 группа - 1 неудачное ЭКО ($n=92$); 2 группа - 2 неудачных ЭКО ($n=58$); 3 группа - 3 и более неудачных ЭКО ($n=79$); 4 группа - неэффективные ИСМ ($n=43$); в группу сравнения включены женщины и мужчины из супружеских пар с одной и более успешно завершенными процедурами ЭКО ($n=32$). Типирование аллельных вариантов генов системы HLA класса II (DRB1*, DQA1*, DQB1*) осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с наборами для молекулярно-генетического тестирования «HLA-DRB1», «HLA-DQA1», «HLA-DQB1» («ДНК-Технология», Россия).

Результаты. У женщин с 2 неэффективными циклами ЭКО статистически чаще обнаружен аллель DQA1*01:02 (41,4% и 18,8% в группе сравнения; $\chi^2=4,8$; $p < 0,05$). Кроме того, в этой группе женщин наблюдалась тенденция к снижению частоты встречаемости варианта гена DQA1*01:01, близкая к статистически значимой (29,3% и 50,0%; $\chi^2=3,8$; $p < 0,05$). У женщин с тремя и более неэффективными циклами ЭКО отмечалась тенденция к уменьшению распространенности аллеля DQA1*01:03 (8,3% и 21,9%; $\chi^2=3,5$; $p < 0,05$). У мужчин из супружеских пар с одной, двумя, тремя и более неудачными попытками ЭКО достоверно реже, чем в группе сравнения регистрировался вариант гена DQA1*05:01 (40,2%, 39,7%, 44,3% и 71,9%; $\chi^2=9,5$, $\chi^2=8,6$, $\chi^2=7,0$; $p < 0,05$, соответственно), статистически чаще - аллель DQA1*01:01 (29,3%, 32,8%, 29,1% и 9,4%; $\chi^2=5,2$, $\chi^2=6,1$, $\chi^2=4,9$; $p < 0,05$, соответственно). У мужчин с одной неудачной попыткой ЭКО обнаружено увеличение частоты встречаемости специфичности DQB1*05:01 (29,3% и 9,4%; $\chi^2=5,2$; $p < 0,05$), а с неэффективными ИСМ - снижение DRB1*11 (9,3% и 28,1%; $\chi^2=4,5$; $p < 0,05$) и DQA1*05:01 (41,9% и 71,9%, $\chi^2=6,7$; $p < 0,05$). В последней из групп зафиксирована тенденция к уменьшению выявляемости DQB1*02:01, близкая к достоверной (27,9% и 50,0%; $\chi^2=3,8$; $p < 0,05$). При проведении сравнительной оценки наличия общих специфичностей HLA класса II у супружеских пар было установлено, что достоверных различий в частоте распределения гомологичных аллелей у супругов с неудачными попытками ЭКО и ИСМ и в группе сравнения не установлено ($\chi^2 < 3,84$; $p > 0,05$).

Выводы. Таким образом, распределение генов системы HLA класса II у супружеских пар с неэффективными попытками ЭКО и ИСМ имеет существенные различия с теми супругами, у которых эти процедуры заканчивались беременностью и родами. Наличие у супругов общих аллелей системы HLA класса II не влияет на эффективность ВРТ, поэтому основное внимание перед проведением процедуры ЭКО необходимо уделять специфичности антигенов HLA у супружеских пар.

Клеина Е.В.¹, Волошин С.В.¹, Вокуева Ю.С.¹, Муштакова О.Д.¹, Мартыненко Л.С.¹,
Бакай М.П.¹, Руженкова Ю.С.¹, Линников С.Ю.¹, Карягина Е.В.², Успенская О.С.³,
Зюзгин И.С.⁴, Бессмельцев С.С.¹, Сидоркевич С.В.¹, Мартынкевич И.С.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург;

²Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 15», г. Санкт-Петербург;

³Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Ленинградская областная клиническая больница», г. Санкт-Петербург

⁴ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава России, г. Санкт-Петербург

ЛИМФОМА ИЗ КЛЕТОК МАНТИЙНОЙ ЗОНЫ – ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРАТИФИКАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ

Введение. Лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ) – неходжкинская В-клеточная лимфома с высокой частотой нестабильности генома, ассоциированная с низкой чувствительностью к проводимой терапии, короткой общей и безрецидивной выживаемостью (БРВ). В последние несколько лет при ЛКМЗ уделяют особое внимание аномалиям гена С-МУС (транслокация или амплификация), поскольку отмечено, что одновременное наличие транслокаций генов CCND1 и С-МУС сочетается с плеоморфным/бластоидным морфологическим вариантом опухоли, рефрактерным течением заболевания и крайне неблагоприятным прогнозом. Такие случаи ЛКМЗ отнесены в отдельную подгруппу «double-hit» ЛКМЗ, изучение которой представляет на сегодняшний день особый интерес.

Цель. Выявить спектр и частоту встречаемости хромосомных и молекулярно-генетических aberrаций, обуславливающих течение ЛКМЗ.

Материалы и методы. Приведены результаты стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) 51 больного и FISH-исследований у 75 пациентов с диагнозом ЛКМЗ. СЦИ выполнялось методом G-banding на клетках костного мозга или периферической крови. Транслокация t(11;14)(q13;q22), перестройка генов TP53, MYC определялись FISH-методом с использованием locus-специфичных ДНК-зондов.

Результаты. При СЦИ патологический кариотип обнаружен у 25/51 (49,0%) пациентов. Транслокация t(11;14)(q13;q22) выявлена у 23/51 (45,1%) больных. В составе комплексного кариотипа транслокация t(11;14)(q13;q22) определялась у 16/51 (31,4%) пациентов. Параллельное включение FISH-исследования в алгоритм диагностики пациентов с ЛКМЗ позволило нам выявлять дополнительные хромосомные aberrации (ДХА). Так, у больных с нормальным кариотипом транслокация t(11;14)(q13;q22) обнаружена еще у 18/51 (35,3%) случаях.

Перестройки гена С-МУС выявлены у 16/75 (21,3%) пациентов. В данной группе хромосомные aberrации обнаружены у 7/11 (63,6%) больных (у 5 митозы не получены). У всех пациентов транслокация t(11;14)(q13;q22) выявлена или как одиночная хромосомная aberrация (1/7 (14,3%)) или в составе комплексного кариотипа (6/7 (85,7%)) в сочетании с аномалиями 7 и 17 хромосом у 83,4% больных. У 8/16 (50,0%) пациентов с перестройкой С-МУС сочеталась с делецией гена TP53.

Во второй группе больных 59/75 (78,7%) перестройки гена С-МУС не выявлены. Хромосомные

aberrации у них обнаруживались у 18/39 (46,2%) пациентов, в том числе комплексные изменения кариотипа у 10/18 (55,6%) больных. Транслокация t(11;14)(q13;q32) – у 16/18 (88,9%) пациентов. Делеция гена TP53 определялась у 10/59 (16,9%) больных.

Предварительный анализ данных пациентов с ЛКМЗ выявил, что наличие комплексных изменений кариотипа, делеции TP53 и аномалий С-МУС имеет значимое неблагоприятное влияние на клиническое течение заболевания по сравнению с группой стандартного риска (СР). У пациентов группы высокого молекулярного риска (ВР) отмечались быстрая прогрессия, продвинутые стадии заболевания и низкая выживаемость. Медиана БРВ в группе пациентов ВР составила 12,5 месяцев, в то время как у больных группы СР медиана БРВ не достигнута.

Выводы. Генетическая диагностика ЛКМЗ, включающая СЦИ и FISH-исследования, помогает выделять группу пациентов ВР: «double-hit» ЛКМЗ и с комплексными нарушениями кариотипа. Также было показано, что в группе пациентов с изменениями гена С-МУС чаще выявлялись прогностически неблагоприятные ДХА: комплексные изменения кариотипа (наличие трех и более aberrаций) – 35,7% и 16,9%, и aberrации с вовлечением гена TP53 – 50,0% и 16,9%. Выявление изменений в данных генах ассоциировано с более короткими показателями БРВ. Полученные результаты исследования позволяют определять группу пациентов ВР с необходимостью безотлагательного применения высокодозной химиотерапии и современных эффективных терапевтических подходов.

**Комиссаров К.А. , Солдатенков В.Е. , Папаян Л.П., Капустин С.И. , Кузакбирдиева О.Х.,
Солдатенкова О.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА АРТЕРИЯХ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЯМИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ

Введение. Одной из актуальных проблем современного здравоохранения является выяснение основ развития сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на то, что феномен тромбофилии связывают с развитием венозного тромбоэмболизма, в последние годы интенсивно проводятся исследования по поиску факторов риска артериального тромбоза. В основе патогенеза последних, как известно, лежат два процесса: атеросклероз и последующий тромбоз периферических артерий. При этом атеросклеротические изменения сосудов более характерны для лиц пожилого возраста, тогда как у молодых пациентов больший вклад в формирование патологии вносят нарушения гемостаза, приводящие к повышенной гиперкоагуляции и тромбообразованию. Таким образом, актуальным является проведение исследований, направленных на изучение ассоциаций прокоагулянтных изменений с риском развития заболевания, в группе больных с ранним дебютом периферического атеросклероза или/и тромбоза.

Цель. Оценить прогностическую значимость показателей состояния системы свертывания крови у пациентов после реконструктивных вмешательств на артериях нижних конечностей в отдаленные сроки.

Материалы и методы. Обследовано 68 пациентов с тромбооблитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей. В первой группе 32 пациента перенесли тромбоз шунтов или зон реконструкции после оперативных вмешательств на бедренно-подколенном артериальном сегменте, в том числе ампутацию конечности в возрасте до 50 лет, вследствие критической ишемии нижних конечностей. Во второй группе 36 пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей без оперативного лечения в анамнезе. Степень хронической артериальной недостаточности (ХАН) варьировалась от Iа до III стадии по Покровскому-Фонтейну. Клинико-инструментальное обследование включало УЗДС артерий нижних конечностей с измерением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ). Методами лабораторной диагностики выполнена развернутая коагулограмма (АПТВ, ПТИ, тромбиновое время, фибриноген, определение активности фактора VIII (FVIII), FIX, фактора Виллебранда (FW), активность антитромбина III, протеина С и протеина S, определение плазменного гомоцистеина). Молекулярно-генетическое исследование включало определение мутации в генах факторов V G1691A (Лейденская мутация), II G20210A (Протромбина). Генотипирование проводили с помощью метода ПЦР-ПДРФ, основанного на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты. Характерным признаком гиперкоагуляции во всех группах оказалась гиперфибриногенемия 30,9% пациентов, при этом средний показатель концентрации фибриногена у обследованных пациентов составил 4,62 г/л. Отмечалось также значимое увеличение активности FVIII, активности и содержания FW. Наиболее агрессивное течение атеросклероза артерий нижних конечностей, проявляющееся артериальными тромбозами, наблюдалось у 12 (37,5%) пациентов первой группы, имеющих в генотипе сочетание мутация в гене V (G1691A) с гипергомоцистеинемией и 6 (16,7%) пациентов во второй группе ($p < 0,05$). Данное сочетание определяло неэффективность реконструктивных операций, увеличение количества тромбозов артерий или шунтов в отдаленные сроки после оперативных вмешательств. Наличие уже известных факторов риска венозного тромбоэмболических осложнений может являться своеобразным «триггером» прогностически неблагоприятного течения для артериального тромбоза. Повышение концентрации фибриногена, активности FW и FVIII у пациентов с облитерирующим атеросклерозом отражают протромботический статус системы гемостаза и выраженность дисфункции эндотелия.

Выводы. Обследование молодых пациентов с неблагоприятным клиническим течением и артериальными тромбозами позволит определять группы повышенного риска по тромботическим осложнениям. Выявленные гиперкоагуляционные изменения в системе гемостаза требуют ранней, интенсивной и пролонгированной антитромботической терапии. Индивидуализация лечения пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей может дать возможность улучшить результаты и исходы реконструктивных вмешательств на артериях нижних конечностей. Неэффективность реконструктивных операций и консервативного лечения может быть обусловлена наличием еще «непризнанных» показателей системы гемостаза и маркеров-кандидатов тромбоэмболизма, требующих дальнейшего изучения.

Комиссаров К.А., Папаян Л.П., Солдатенков В.Е., Кузакбурдиева О.Х., Солдатенкова О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ И ИСХОДОВ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Введение. Неудачи в лечении больных с критической ишемией нижних конечностей во многом обусловлены неадекватным контролем показателей системы гемостаза, биохимических исследований и недостаточной их коррекцией. Несвоевременное определение тактики лечения приводит к резкому росту угрозы потери конечности и инвалидизации пациентов. До сих пор нет единого взгляда на прогностическую значимость тех или иных факторов риска, стандартизированных подходов к оценке величины протромботической опасности и своевременному адекватному назначению антитромботической терапии. Весьма перспективным представляется внедрение индивидуализированного подхода к оценке прогностического потенциала генетических и биохимических показателей системы гемостаза у лиц с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК).

Цель. Определить прогностическую значимость отдельных клинико-лабораторных показателей состояния системы гемостаза при хронической ишемии нижних конечностей.

Материал и методы. Обследовано 47 пациентов с хронической ишемией нижних конечностей со степенью хронической артериальной недостаточности (ХАН) IIb-III стадии по Покровскому – Фонтейну. Пациенты разделены на две группы: 1 группа – 21 больной с прогрессирующим течением заболевания, 2 группа – 26 больных с непрогрессирующим течением. Разделение на группы проводили исходя из анамнеза (длительность заболевания, уменьшение дистанции безболевого ходьбы в течение года, длительность сохранения эффекта от консервативного лечения). Всем пациентам проведено УЗДС артерий нижних конечностей с измерением лодыжечно – плечевого индекса (ЛПИ). Методами лабораторной диагностики выполнены следующие исследования: АПТВ, ПТИ, тромбиновое время, фибриноген, определение активности фактора VIII (FVIII), FIX, фактора Виллебранда (FW), активность антитромбина III, протеина С и протеина S. В плазме крови определяли уровень гомоцистеина и

наличие антифосфолипидных антител волчаночного типа. С помощью ПЦР выполнено исследование факторов системы гемостаза (FII, FV, FI, PAI-1, MTHFR). Для анализа результатов лабораторного и ультразвукового исследования дополнительно была выделена группа сравнения, включающая 42 здоровых добровольца, без признаков обитерирующего атеросклероза периферических артерий.

Результаты. Согласно полученным результатам, больных со значением ЛПИ до 0,7 было статистически значимо больше в группе с непрогрессирующим течением – 7 (26,9%), по сравнению с группой с прогрессирующим течением – 4 (19%). Обратная зависимость отмечена при значении ЛПИ 0,49-0,4. Пациентов с данными показателями было статистически значимо больше в группе с прогрессирующим течением – 9 (42,8%), по сравнению с больными с непрогрессирующим течением – 6 (23%). Наличие мутации в гене протромбина (G20210A) и лейденской мутации фактора V повышали риск тромботических осложнений при наличии гемодинамических стенозов периферических артерий любой степени и локализации. Мутация 455G/A в гене фактора I (FI) приводила к стойкому повышению концентрации фибриногена в плазме крови обследованных больных. Частота тромботических осложнений была выше у больных, имеющих в генотипе гомозиготный вариант С677Т гена MTHFR в сочетании с умеренной гипергомоцистеинемией (до 50 мкмоль\л).

Выводы. Адекватная антитромботическая терапия показана при всех видах ишемии нижних конечностей, так как значимое повышение концентрации фибриногена, активности и содержания фактора Виллебранда, активности фактора VIII, являются свидетельством активации плазменного звена гемостаза. Выявленные прокоагулянтные изменения в системе гемостаза требуют ранней диагностики, индивидуализации схем терапии, принятия адекватных решений о возможных исходах оперативного лечения.

Коцелябина П.В., Федорова Л.В., Лепик К.В., Кондакова Е.В., Залялов Ю.Р., Борзенкова Е.С., Волков Н.П., Моисеев И.С., Михайлова Н.Б., Кулагин А.Д.

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург

ОПЫТ НИИ ДОГИТ ИМ. Р.М. ГОРБАЧЕВОЙ В ТЕРАПИИ МАНТИЙНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ

Введение. Мантийноклеточная лимфома (МКЛ) – редкий вариант В-клеточных лимфом, исторически имеющий неблагоприятный прогноз. Включение высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических

стволовых клеток (ауто-ТГСК), и поддерживающей терапии ритуксимабом позволили улучшить результаты лечения молодых пациентов с МКЛ. Однако несмотря на значительные успехи терапии первой линии не удается достигнуть длительной ремиссии или излечения

заболевания у части пациентов с резистентным и рецидивирующим (р/р) течением. Таким образом, поиск оптимального подхода к терапии р/р МКЛ является актуальной проблемой.

Цель. Оценить результаты терапии пациентов с МКЛ в НИИ ДОГиТ им. Р.М.Горбачевой ПСПбГМУ им. И.П.Павлова.

Материалы и методы. В ретроспективное одноцентровое исследование было включено 92 пациента (57 м и 35 ж) с гистологически подтвержденным диагнозом МКЛ. Первичной конечной точкой была общая выживаемость (ОВ) пациентов с МКЛ, определяемая как время от начала терапии 1 линии до смерти по любой причине. Вторичной конечной точкой была беспрогрессивная выживаемость (БПВ) – время от начала терапии 1 линии до прогрессирования заболевания, рецидива или смерти по любой причине, БПВ была цензурирована на момент начала второй линии терапии. При оценке выживаемости данные были подвергнуты цензуре согласно дате последнего контакта в случае отсутствия события во время наблюдения. ОВ и БПВ были оценены с использованием метода Каплана-Мейера с 95% доверительным интервалом. Все анализы были выполнены с использованием программного обеспечения SPSS v. 17.0 и R 3.6.1

Результаты. Все пациенты (n=92) были включены в анализ эффективности терапии. Медиана возраста пациентов составила 60 (28-81). Среди морфологических подтипов классический вариант встречался в 65% (n=60), бластоидный – в 16% (n=15), плеоморфный – в 7% (n=6), неутонченный – в 5% (n=5). II стадия на момент диагноза наблюдалась у 3% (n=3), III – у 17% (n=16), IV – у 79% (n=72). На момент диагноза ECOG 1 у 46% (n=42), ECOG 2 у 29% (n=27), ECOG 3 у 4% (n=4). У 66% (n=61) пациентов была оценена экспрессия Ki67: в 11% (n=10) случаев экспрессия была на уровне менее 10%, в 24% (n=22) экспрессия на уровне 10–29% и в 31% (n=29) на уровне более 30%. Терапия 1 линии включала: СНОР-подобные режимы у 41%

(n=38), режимы с высокодозным цитарабином у 37% (n=34), R-BAC у 3% (n=3), RB у 4% (n=4), другие режимы у 14% (n=13). Ауто-ТГСК в 1 линии проводилась в 24% (n=22) случаев, в последующих линиях терапии в 9% (n=8) случаев. Медиана времени от постановки диагноза до ауто-ТГСК составила 10 (5-28). Поддерживающая терапия ритуксимабом проводилась 48% (n=44) пациентам. Полный ответ (ПО) после первой линии терапии наблюдался у 51% (n=47), частичный ответ (ЧО) – у 22% (n=20), стабилизация заболевания (СЗ) – у 11% (n=10), прогрессирование (ПЗ) 10% (n=9). Ибрутиниб в любой линии терапии получили 22% (n=20) пациентов со следующими ответами: ПО у 40% (n=8), ЧО – у 20% (n=49), СЗ – у 20% (n=2). Бортезомиб в любой линии терапии получили 15% (n=14) со следующими ответами: ПО наблюдался у 36% (n=5), ЧО – у 35% (n=5), СЗ – у 14% (n=2), ПЗ – у 7% (n=1). Леналидомид в любой линии терапии получили 9% (n=8) со следующими ответами: ПО наблюдался у 25% (n=2), ЧО – у 13% (n=1), СЗ – у 13% (n=1), ПЗ – у 50% (n=4). Темсиrolимус в любой линии терапии получили 3% (n=3) пациентов. Алло-ТГСК была проведена у 8% (n=7) пациентов. Медиана наблюдения от начала терапии первой линии составила 26 месяцев (1-160). Двухлетняя ОВ для всей группы – 91,4%. ОВ пациентов, которым была проведена ауто-ТГСК в 1 линии, в последующих линиях или не была проведена совсем составила 86,4%, 75% и 71% (p=0,032), соответственно. ОВ пациентов с поддерживающей терапией ритуксимабом после 1 линии терапии и без составила 81,8% и 68,8% (p=0,039), соответственно. Двухлетняя БПВ для всей группы исследования – 87,2%.

Выводы. Результаты применения ауто-ТГСК в 1 линии превосходят результаты иных стратегий лечения, а поддерживающая терапия ритуксимабом значительно улучшает ОВ. При р/р МКЛ эффективно использование новых таргетных препаратов, но потенциально излечивающим методом остается алло-ТГСК.

Кузакбирдиева О.Х., Комиссаров К.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

НОВЫЕ АСПЕКТЫ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФУЗИОННОГО АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО РАСТВОРА «КОНФУМИН»

Введение. Критическая ишемия (КИ), свидетельствующая о полной декомпенсации кровообращения, наблюдается с частотой 400-1000 на 1 млн. населения в год или у 15-20% больных с окклюзирующими заболеваниями периферических сосудов. Консервативная терапия сопровождается потерей конечности у 37% больных в течение года от начала проявлений КИ. Во многом единственным видом лечения хронической ишемии нижних конечностей до настоящего времени является хирургическая реваскуляризация, однако она возможна лишь у 37-50% пациентов.

Таким образом, формируется концепция комплексного лечения ЗПАНК, сопровождающихся ХИНК, вклю-

чающего комбинированную антитромботическую терапию и инфузионную метаболическую терапию. Представляется перспективным использование при ЗПАНК в качестве метаболического препарата антигипоксанта действия фумаратсодержащих растворов, в том числе наиболее концентрированного из них – «Конфумина», применявшегося ранее в практике реанимационной интенсивной терапии острого коронарного синдрома.

Цель. Изучение эффективности применения инфузионного раствора «Конфумин» в лечении пациентов с облитерирующими заболеваниями периферических артерий нижних конечностей.

Материалы и методы. В исследование включено 79 пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей IIБ-III стадии по Покровскому-Фонтейну, которые наблюдались в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в 2018-2020 гг. Больные разделены на 2 группы. В группу 1 (основную) включены 37 пациентов с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей, получавшие антигипоксикант «Конфумин» в объеме 100 мл в сочетании с комбинированной антитромботической терапией (Ривароксабан 2,5 мг x 2 раза в день и Ацетилсалициловая кислота 100 мг x 1 раз в день). Пациенты получали инфузии раствора, состоящие из 0,9% хлорида натрия в объеме 200 мл с пентоксифиллином (10 мл), и 0,9% хлорида натрия 200 мл с актовегином (10 мл). Продолжительность курса лечения 10 дней. Группу 2 (контрольную) составили 42 пациента. Антитромботическая терапия и продолжительность курса лечения были такими же, как у пациентов группы 1. Пациентам, включенным в исследование, выполнялись общеклинические и инструментальные методы исследования, которые проводились двукратно в 1-е и на 12-е сутки госпитализации.

Результаты. Средний возраст пациентов основной группы составил 65,0±6,4 лет. Возраст пациентов группы контроля статистически не отличался и составил 66,6±5,9 лет. Гендерное распределение в двух группах статистически не различалось – в обеих группах преобладали мужчины. Сахарный диабет и артериальная гипертензия часто преобладали у пациентов обеих групп. При составлении клинико-анамнестической характеристики групп, было отмечено, что по большинству изучаемых признаков группы были сопоставимы.

При исследовании гематологических показателей

у пациентов основной и контрольной групп до начала и после лечения существенных различий не выявлено, все показатели были в пределах нормы.

При исследовании показателей системы гемостаза уровень фибриногена, а также активность фактора VIII и ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда были выше контрольных значений у пациентов контрольной группы по сравнению с пациентами основной группы. На фоне проведенного комплексного лечения, через 12 дней после госпитализации, прослеживалось снижение уровня маркеров дисфункции эндотелия (ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда), VIII фактора у первой группы на фоне введения раствора «Конфумин», в отличие от второй группы.

В результате исследования процесса генерации тромбина с помощью теста обнаружены достоверные различия в основной группе пациентов по сравнению с группой контроля после проведенного лечения. Наблюдалось повышение временного показателя ТГТ – LT у пациентов группы контроля (3,2±0,6 против 2,7±0,6 мин, p<0,01).

Выводы. Поиск новых метаболических воздействий при хронической критической ишемии нижних конечностей, с учетом тенденции развития комбинированных методов антитромботической терапии, является перспективным. Представляется важным, что Конфумин может с успехом применяться совместно с противотромботическими препаратами, используемыми при лечении ЗПАНК, не снижая их эффективность, одновременно потенцируя действие комбинации антикоагулянта и антиагреганта на эндотелий пораженных артерий.

Кулешова А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИЙ КРОВОТОКА У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Введение. В лечении гемобластозов достигнуты значительные успехи, связанные с использованием таргетной терапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Однако их применение увеличило риск возникновения инфекционных осложнений, среди которых особую опасность представляют системные инфекции кровотока. Летальность при сепсисе, вызванном грамотрицательными бактериями, может достигать 57%.

Цель. Определить частоту и этиологическую структуру инфекций кровотока у больных гемобластозами в период с 2010 по 2021 гг. и совершенствование стратегии диагностики и контроля инфекционных осложнений у больных гемобластозами.

Материалы и методы. Исследовали частоту и этиологическую структуру инфекций кровотока у больных с различными онкогематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в гематологической клинике института в период с 2010 по 2021 годы. Забор крови для проведения бактериологического ис-

следования выполняли до начала противомикробного лечения и затем регулярно при эпизодах лихорадки. Культивирование посевов крови осуществляли в автоматическом анализаторе BacT/ALERT 3D (BioMérieux, Франция). Параллельно с фенотипической идентификацией проводили идентификацию положительных гемокультур с помощью метода мультиплексной ПЦР в реальном времени. В период с 2018 по 2020 гг., наряду с определением этиологии инфекционных осложнений проводили стратификацию бактериальных инфекций по степени тяжести в соответствии с консенсусом Sepsis 3. Определяли также бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) по выявлению генов бета лактамаз расширенного спектра (БЛРС) с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты. Исследование показало, что среди положительных посевов с 2010 по 2018 гг. грамположительные микробы были выявлены в 69,2% гемокультур, грамотрицательные – в 30,8%. Установлено, что наибольшую опасность для больных представляют

инфекции кровеносного русла, вызванные грамотрицательными бактериями. В 2019 и 2020 гг. удельный вес грамотрицательных бактерий в структуре инфекций кровеносного русла повысился и составил 75 и 74% соответственно. Среди грамотрицательных бактерий весомую долю составляли энтеробактерии с продукцией БЛРС. В нашем исследовании БЛРС выявлена у 24% культур, в том числе и у штаммов, выделенных из крови. Колонизация кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС рассматривается как предиктор развития бактериемий, вызванных тем же видом бактерий. Преобладающим путем проникновения микробов в кровь является эндогенное инфициро-

вание через кишечник. Этому способствует нарушение кишечной микробиоты и развитие мукозита желудочно-кишечного тракта.

Выводы. Бактериальные инфекции кровеносного русла, вызванные грамотрицательными бактериями, значительно отягощают течение заболевания у больных гемобластозами. Использование в клинической практике методов контроля инфекции (выявление штаммов с множественной резистентностью к антибиотикам и использование стратегии контроля антимикробной терапии) способствует улучшению результатов лечения онкогематологических больных.

Курочкин Д.В.¹, Субботина Т.Н.^{1,2}, Хазиева А.С.³, Васильев Е.В.³, Михалёв М.А.³

¹ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск

²ФГБУ Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России, Красноярск

³КГБУЗ Краевая клиническая больница, Красноярск

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДОВ ПРИ АНАЛИЗЕ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ CALR

Введение. Поскольку ассоциированные с онкологическими заболеваниями, в том числе с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями (Ph-МПН), соматические мутации очень разнообразны, встречаются с разной частотой и разным уровнем аллельной нагрузки, то на начальном этапе выполнения молекулярно-генетических диагностических процедур по выявлению и идентификации таких мутаций, желательнее иметь возможность проведения в лаборатории скрининговых методов. Это особенно важно, когда проводится анализ редких и разнообразных мутаций, например, таких как мутации в гене CALR. В качестве скрининговых методов для выявления CALR мутаций могут быть использованы как гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ), так и анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM).

Цель. Показать возможность использования HRM и гетеродуплексного анализа в качестве скрининговых тестов для выявления CALR мутаций, а также определить чувствительность данных методов.

Материалы и методы. В ходе работы были проанализированы 10 CALR «+» образцов ДНК от пациентов с различными фенотипическими вариантами Ph-МПН. Гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в ПААГ проводили с использованием набора реагентов «ПЦР-комплект» (Синтол, Москва) на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США). ПЦР-продукты детектировали методом электрофореза в 8% ПААГ. ПЦР-HRM проводили с использованием набора реагентов Precision Melt Supermix (Bio-Rad, США). ПЦР с дополнительным этапом плавления высокого разрешения проводилась на приборе «CFX96» (Bio-Rad, США). Анализ падения уровня флуоресценции с повышением температуры на этапе плавления проводился с использованием программы «Precision Melt Analysis» (Bio-Rad, США).

Для анализа порога определения доли мутантного аллеля осуществляли клонирование ДНК, выделенной из клинических образцов, в вектор pGem-T по стандартной методике («Promega», США).

Результаты. В результате проведенного гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ мутации в области 9 экзона гена CALR были выявлены во всех 10 образцах. Стоит отметить, что фрагменты, соответствующие мутантным аллелям, визуализируются не во всех образцах, а именно на дорожке от образцов с небольшими вариантами делеций/вставок или их комбинаций, фрагмент, соответствующий мутантному продукту, не визуализируется. При этом, во всех пробах, имеющих мутации визуализируются дополнительные полосы, расположенные выше фрагмента дикого типа, соответствующие гетеродуплексам, образованным сочетанием фрагментов дикого и мутантного типов аллелей.

По результатам анализа порога определения доли мутантного аллеля для гетеродуплексного анализа было показано, что в случае мутации с.1154_1155insTTGTC полосы, соответствующие гетеродуплексам четко визуализируются в образцах с уровнем аллельной нагрузки 6,25% и выше, в случае же мутации с.1092_1143del полосы четко визуализируются в образцах с уровнем аллельной нагрузки 3,13% и выше.

По результатам скрининга соматических мутаций в гене CALR методом HRM с использованием амплификатора «CFX96» и программы «Precision Melt Analysis» нормализованные кривые плавления 9 из 10 образцов пациентов четко показали отличия от таковых в группе дикого типа. Образец с мутацией с.1154_1155insTTGTC был ложно отнесен в кластер с диким типом. Вероятно, это обусловлено низким уровнем аллельной нагрузки мутации в ДНК у данного пациента (9%).

По результатам анализа порога определения доли мутантного аллеля для HRM-анализа было показано, что в случае мутаций с.1154_1155insTTGTC и с.1092_1143del порог определения составил от 12,5% присутствия мутантного аллеля в пробе.

Выводы. В настоящем исследовании показана возможность использования гетеродуплексного анализа и HRM, для выявления различных вариантов

мутаций в 9 экзоне гена CALR. Предлагаемые методы подходят для выявления любых вариантов мутаций (делеции/вставки или их комбинации) в гене CALR. Порог определения в случае анализа мутации c.1154_1155insTTGTC составляет от 6,5% присутствия

мутантного аллеля в пробе для гетеродуплексного анализа и от 12,5% для HRM-анализа, в случае анализа мутации c.1092_1143del – от 3,13% для гетеродуплексного анализа и от 12,5% для HRM-анализа.

**Маркелов В.В.¹, Рогачева Ю.А.¹, Попова М.О.¹, Волкова А.Г.¹, Николаев И.Ю.¹,
Пинегина О.Н.¹, Игнатьева С.М.², Т.С. Богомолова², Волков Н.П.¹, Бондаренко С.Н.¹,
Климко Н.Н.^{1,2}, Кулагин А.Д.¹**

¹ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава РФ, Санкт-Петербург

²ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова Минздрава РФ, Санкт-Петербург

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Введение. Текущие европейские руководства по первичной противогрибковой профилактике у взрослых реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) предлагают рекомендации в зависимости от фазы посттрансплантационного периода, где первичная противогрибковая профилактика требуется трём группам пациентов. Группа 1 – группа низкого риска развития плесневых (мицелиальных) инвазивных микозов (ИМ) в период «до приживления», группа 2 – группа высокого риска плесневых ИМ в период «до приживления», и группа 3 – группа высокого риска развития ИМ в период «после приживления». Ограничения этого руководства включают неполный список групп риска, научно-обоснованных препаратов и их форм введения.

Цель. Изучить реализуемость европейских рекомендаций по противогрибковой профилактике у большой когорты взрослых реципиентов алло-ТГСК и частоту прорывного инвазивного аспергиллеза (ИА).

Материалы и методы. Мы проанализировали 672 взрослых пациента, получивших алло-ТГСК с 2017 по 2020 гг. в СИС 725. Пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с типом противогрибковой профилактики в первые 100 дней посттрансплантационного периода: Группа 1 – первичная противогрибковая профилактика флуконазолом (низкий риск развития плесневых ИМ, n=434); 2-я группа – первичная противогрибковая профилактика препаратами активными в отношении плесневых возбудителей ИМ (высокий риск плесневых ИМ, включая случаи непрофилактического применения, n=212) и 3-я группа – вторичная противогрибковая профилактика у пациентов с предсуществующим ИА. В течение 1-летнего периода наблюдения было диагностировано 2 доказанных и 41 вероятный случая прорывного ИА в соответствии с критериями EORTC / MSG. Медиана времени наблюдения за всеми пациентами составила 12 (0-51) месяцев.

Результаты. Сравнительный анализ показал основные характеристики пациентов группы высокого риска, у которых применялись препараты в активные отношении плесневых возбудителей ИМ преимущественно в качестве первичной противогрибковой профилактики: отсутствие полной ремиссии основ-

ного заболевания (p=0,002), повторная алло-ТГСК (p<0,001), трансплантация от гаплоидентичного донора (p<0,001), реактивация ЦМВ (p<0,001), острая РТПХ 3-4 степени (p<0,001), тяжелая хроническая РТПХ (p=0,010) и режим кондиционирования со сниженной интенсивностью (p = 0,001). В группу низкого риска попали пациенты, которым выполнена алло-ТГСК от полностью совместимого родственного (p = 0,002) и неродственного доноров (p = 0,009), использование миелоаблативного режима кондиционирования (p <0,001). Годовая КЧ прорывного ИА после алло-ТГСК в группе низкого риска после первой и повторной алло-ТГСК составила 3,7% и 8,6% соответственно, в группе высокого риска – 10 % и 26%, у пациентов с ранее существовавшим ИА – 5% и 14%. Медиана времени развития ИА составила 66 (2–282) дней. Основным органом поражения были легкие 93%. Прорывной ИА был диагностирован с помощью культурального исследования бронхоальвеолярной (БАЛ) или синусовой жидкости в 44% случаев, этиология: *Aspergillus niger* – 8 (42%), *Aspergillus fumigatus* – 7 (36%), *Aspergillus flavus* – 2 (11%), *Aspergillus terreus* – 1 (5%), *Aspergillus spp.* – 1 (5%). Общая 12 недельная выживаемость у пациентов с прорывным ИА составила 73%. Многофакторный анализ показал, что значимыми факторами риска развития ИА после алло-ТГСК в группе 1 был диагноз Ph (-) МПН (p=0,025), а в группе 2 – диагноз НХЛ (p=0,007). У пациентов с ранее существовавшим ИА из-за небольшого количества случаев ИА (n = 2) анализ не проводился.

Выводы. Исследование КЧ прорывного ИА идентифицировало группу сверхвысокого риска – повторная алло-ТГСК. Наиболее частым этиологическим агентом прорывного ИА был *Aspergillus niger*. Диагноз Ph (-) МПН был связан с более высоким риском ИА в посттрансплантационном периоде у пациентов, получавших профилактику флуконазолом, а диагноз НХЛ – у пациентов, получавших первичную профилактику препаратами активными в отношении мицелиальных возбудителей.

Маслюкова И.Е.¹, Субботина Т.Н.^{1,2}, Мартынова Е.В.³, Астафьева Е.Г.³, Бахтина В.И.³

¹ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

²ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», Красноярск

³КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Красноярск

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ FLT3 И NPM1 МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОМЛ ИЗ КРАСНОЯРСКОГО РЕГИОНА

Введение. Мутации в генах FLT3 и NPM1 чаще остальных обнаруживают при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ): в 30-40 и 25-30% случаях, соответственно. Выявлять мутации в этих генах важно до начала лечения у пациентов в дебюте ОМЛ, а также при диагностике рецидивов. Так NPM1 мутации обуславливают благоприятный прогноз. В тоже время FLT3 мутации, а именно FLT3-ITD, ассоциированы с плохим прогнозом. FLT3-ITD+ пациентам к классическому курсу химиотерапии назначают ингибиторы тирозинкиназ. Одновременное присутствие FLT3-ITD и NPM1 мутаций повышает выживаемость, в отличие от FLT3-ITD в отсутствие NPM1. Также обращают внимание на FLT3-TKD мутации, которые могут быть ассоциированы с резистентностью к ингибиторам тирозинкиназ.

На сегодняшний день важно не просто выявить FLT3 и NPM1 мутации, а определить соотношение сигналов для стратификации риска. По этой причине «золотым стандартом» для количественной оценки данных мутаций используют фрагментный анализ (предел обнаружения от 5-10% мутантного аллеля).

Цель. Поиск и количественная оценка соматических мутаций в генах FLT3 и NPM1 у пациентов с диагнозом ОМЛ из Красноярского региона при использовании метода фрагментного анализа.

Материалы и методы. Было исследовано 24 пациента (возраст от 19 до 88 лет на момент взятия материала, средний возраст 53 года) проходивших лечение в 2020-21 г.г. в КГБУЗ «Краевая клиническая больница». Троице пациентам был диагностирован вторичный ОМЛ. У четырнадцати пациентов был определен фенотип по классификации FAB: двое с M0, один с M², трое с M3, семь с M4, один с M5.

Мутации FLT3 (ITD и TKD) и NPM1, а также соотношение сигналов определяли методом фрагментного анализа. Для этого ПЦР-продукты с 5'-FAM флуоресцентными метками смешивали с GeneScan™ 500LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, USA) и подвергали капиллярному электрофорезу с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, USA). Для анализа FLT3-TKD флуоресцентно-меченные ампликоны дополнительно гидролизировали рестриктазой EcoRV (СибЭнзим, Россия). Соотношение сигналов рассчитывали как соотношение площадей под кривой зависимости концентрации от времени мутантного и дикого типа (согласно стратификации пациентов в исследовании RATIFY). Положительные образцы

№1, №2, № 12, №19 секвенировали с использованием BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

Результаты. В результате проведения фрагментного анализа, FLT3 мутации были выявлены у 6 пациентов с ОМЛ (25%), что соответствует литературным данным.

У пяти пациентов были обнаружены FLT3-ITD мутации (20,8%). У пациента №1 со вторичным ОМЛ и ранним рецидивом обнаружена мутация с.1774_1838-1dup (соотношение сигналов 0,233), представляющая собой тандемный повтор (ITD) длиной 153 bp, который по данным секвенирования включает часть 14 экзона и весь 14 интрон. У пациента №6 с ранним рецидивом обнаружена FLT3-ITD мутация (соотношение сигналов 0,097) с ITD длиной около 99 bp. У пациента №12 с M3 обнаружена мутация с.1719_1778dup (соотношение сигналов 0,665) с ITD длиной 60 bp. У пациента №19 с M4 обнаружена мутация с.1761-1787dup (соотношение сигналов 0,377) с ITD длиной 27 bp. У пациента №23 со вторичным ОМЛ обнаружена FLT3-ITD мутация (соотношение сигналов 0,039) с ITD длиной около 36 bp. Мутация с.1719_1778dup представлена в базе данных COSMIC (COSV54051798), тогда как с.1774_1838-1dup и с.1761_1787dup по всей видимости являются неисследованными новыми мутациями.

FLT3-TKD мутация выявлена у одного пациента (4,2%). У пациента №2 с M3 и поздним рецидивом обнаружена наиболее распространенная мутация с.2503G>T (соотношение аллелей 1,862).

Мутации NPM1 были выявлены у троих FLT3-ITD+ пациентов (12,5%) и не выявлены у FLT3- пациентов. У всех троих пациентов (№1, №19, №23) была выявлена одна и та же мутация типа A с.860-863dup (соотношение сигналов для №1 – 0,481, №19 – 0,633, №23 – 0,031).

Выводы. Впервые в Красноярском крае был использован метод фрагментного анализа для обнаружения и количественной оценки FLT3 и NPM1 мутаций у пациентов с ОМЛ. Использованный метод позволил выявить мутации у 6 из 24 пациентов с ОМЛ и провести количественную оценку выявленных мутаций. Кроме того, были выявлены две новые FLT3-ITD мутации, не представленные в COSMIC.

Минаев М.С.¹, Перфилова Е.А.², Дьяконов Д.А.²

¹ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», онкохимиотерапевтическое отделение, дневной стационар, г. Калининград

²ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России, Киров

ОЦЕНКА CD15+ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ НОДУЛЯРНОМ СКЛЕРОЗЕ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА

Введение. Нодулярный склероз относится к наиболее часто встречающемуся варианту классической лимфомы Ходжкина (кЛХ). Заболевание характеризуется гетерогенными морфологическими признаками. Субстрат опухолевых элементов немногочисленный, с выраженным неопухолевым реактивным клеточным компонентом. Патогенез связан с особенностями взаимодействия этих опухолевых клеток с ассоциированным микроокружением, которое состоит из иммунного (Т- и В-лимфоциты, опухоль-ассоциированные макрофаги и нейтрофилы, дендритные клетки) и неиммунного компонентов (внеклеточный матрикс, цитокины, хемокины, факторы роста, стромальные и мезенхимальные клетки).

На сегодняшний день опухоль-ассоциированные нейтрофилы (TAN) изучены недостаточно. Большинство данных получено в результате экспериментальных работ на животных. Согласно литературным источникам, выделяют два основных фенотипа TAN. На ранней стадии онкогенеза преобладают клетки с N1-фенотипом, обладающие цитотоксическим эффектом, обеспечивающие противоопухолевую защиту. Проонкогенный эффект опухоль-ассоциированных нейтрофилов N2-фенотипа связан с потенцированием роста опухоли путем реконструкции внеклеточного матрикса, инвазии опухоли и метастазирования, активации ангиогенеза и лимфогенеза, усиления иммуносупрессии за счет выделения проканцерогенных цитокинов тем самым способствуя прогрессированию заболевания.

Прогностическая роль TAN описана при некоторых солидных опухолях. Однако данные, описывающие TAN при лимфопролиферативных заболеваниях, в том числе кЛХ, крайне ограничены. Нами не обнаружены литературные источники, касающиеся изучения особенностей CD15 опухоль-ассоциированных нейтрофилов в опухолевом микроокружении у пациентов с кЛХ.

Цель. Изучить морфометрические особенности CD15 положительных нейтрофилов у пациентов с нодулярным склерозом лимфомы Ходжкина.

Материалы и методы. Исследования выполнены на гистологических срезах лимфатических узлов 74 пациентов с нодулярным склерозом кЛХ. Все больные наблюдались в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2011 по 2018 гг. Соотношение мужчин и женщин составило 45,9% и 54,1% соответственно; медиана возраста – 36 лет. Пациенты разделены на 2 группы: первую (n=34) составили обследуемые, достигшие полной ремиссии после проведения стандартной полихимиотерапии первой линии по схеме BEACOPP-14. Во вторую (n=40) включены больные с рефрактерностью к химиотерапии или минимальным ответом на лечение первой и последующих линий, которым была проведена аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Постановку иммуногистохимических реакций осуществляли по стандартной методике с применением моноклонального антитела к маркеру CD15 (клон Carb-3), DAKO. Для статистической обработки данных применялась программа Stadia.

Результаты. При морфометрическом исследовании определены различия в относительном количестве клеток, экспрессирующих CD15. Установлено, что доля положительных нейтрофилов у больных первой группы существенно ниже, чем во второй: 7,6% (6,7 – 7,9) и 21,8% (20,2 – 23,6) соответственно, $p=0,0015$. При проведении ROC-анализа установлено пороговое значение доли CD15-положительных элементов на уровне 8,5%. При содержании исследуемых кариоцитов равном или выше порогового значения ($\geq 8,5\%$) у 38 из 40 пациентов второй группы отмечалось неблагоприятное течение заболевания, медиана 5-летней общей выживаемости составляла 36 месяцев. При значении CD15+ ниже порогового уровня медиана выживаемости не достигнута.

Выводы. Таким образом, относительное содержание CD15+ нейтрофилов $\geq 8,5\%$ в гистологических срезах лимфоузлов у больных нодулярным склерозом кЛХ может быть связано с неблагоприятным течением заболевания.

Петрова А.Н.¹, Ломаиа Е.Г.², Морозова Е.В.³, Шухов О.А.¹, Челышева Е.Ю.¹,
Немченко И.С.¹, Читанова Т.В.², Власова Ю.Ю.³, Быкова А.В.¹, Гурьянова М.А.¹,
Зарицкий А.Ю.², Туркина А.Г.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

³Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, Санкт-Петербург

ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕРАПИИ АСЦИМИНИБОМ БОЛЬНЫХ ХМЛ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ И НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ НЕСКОЛЬКИХ ЛИНИЙ ЛЕЧЕНИЯ В РОССИЙСКОЙ ПРОГРАММЕ УПРАВЛЯЕМОГО ДОСТУПА (МАР)

Введение. Проблема резистентности и непереносимости ингибиторов тирозинкиназ 2 поколения (ИТК2) у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в настоящее время остается актуальной. Понатиниб продемонстрировал высокую эффективность и может быть терапевтической опцией для больных ХМЛ с резистентностью или непереносимостью доступных ИТК, но высокая частота сосудистых нежелательных явлений (НЯ) ограничивает его широкое применение. Асциминиб – первый препарат из класса ингибиторов STAMP (Specifically Targeting the ABL Myristoyl Pocket) – продемонстрировал большую эффективность по сравнению с бозутинибом у больных ХМЛ в качестве ≥ 3 линии терапии ИТК (исследование III фазы). Асциминиб доступен в России в рамках программы управляемого доступа (МАР), одобренной Novartis.

Цель. Представить первые результаты терапии асциминибом больных ХМЛ в клинической практике в рамках российской программы управляемого доступа

Материалы и методы. В программу МАР были включены 46 больных ХМЛ из 3 российских клиник, которым проводилось лечение асциминибом с сентября 2019 г по июнь 2021 г. Мы проанализировали результаты терапии 32 пациентов, получавших асциминиб не менее 3 месяцев. Набор пациентов, режим дозирования препарата, мониторинг ответов на лечение и контроль токсичности осуществлялись в соответствии с протоколом МАР. Достижение полного цитогенетического ответа (ПЦО), большого молекулярного ответа (БМО) и глубокого молекулярного ответа (МО4) оценивалось с помощью функции оценки кумулятивной частоты событий (CIF).

Результаты. Характеристика больных перед началом терапии асциминибом: 41% мужчин; медиана (Ме) возраста 54 года (от 26 до 81); Ме длительности ХМЛ 8 лет (от 2 до 24); 23 пациента в хронической фазе (ХФ), 7 и 2 больных в анамнезе имели фазу акселерации (ФА) и бластного криза (БК) соответственно. У 19(59%) больных имелись мутации гена BCR-ABL, в том числе у 10(31%) – мутация T315I; у 7(22%) пациентов выявлялись как минимум 2 мутации. У 8(25%) больных были дополнительные хромосомные аномалии (ДХА). Двадцати одному (66%) пациенту проводилась терапия ≥ 4 ИТК, у 14(44%) больных терапия понатинибом в анам-

незе. На момент анализа: Ме длительности терапии асциминибом составила 7 месяцев (мес) (от 4 до 24), у 4(12.5%) пациентов лечение прекращено вследствие неэффективности, все из них живы. Применялись начальные дозы асциминиба 80 мг/сут у 22(69%) и 400 мг/сут у 10(31%) больных.

ПЦО, БМО и МО4 на момент анализа были достигнуты у 32%(8/25), 34%(10/29) и 17%(5/30) больных соответственно (учитывались пациенты без соответствующих ответов на исходном уровне). Кумулятивная частота достижения ПЦО, БМО и МО4 к 6 мес терапии составила 27%, 24% и 19% соответственно.

Для выявления прогностических факторов достижения БМО к 6 мес лечения у 29 больных, исходно не имевших БМО, был выполнен однофакторный анализ. В анализ были включены следующие факторы: начальная доза асциминиба, фаза ХМЛ, наличие мутаций BCR-ABL и ДХА, лучший молекулярный ответ на предыдущей терапии ИТК, молекулярный ответ перед началом приема асциминиба, предпочленность понатинибом, количество препаратов ИТК в анамнезе и длительность терапии перед началом приема асциминиба. Длительность терапии и количество ИТК, наличие ФА и БК в анамнезе, а также мутаций BCR-ABL и ДХА не оказали значительного влияния на достижение БМО. Уровень BCR-ABL $<1\%$ на предыдущих этапах лечения (54% против 0%, $p=0,0008$, отношение рисков 20,9 (2,6-170)) и уровень BCR-ABL $<10\%$ на момент начала лечения асциминибом (44% против 15%, $p=0,035$, отношение рисков 3,8 (1,05-13,6)) оказались значимыми прогностическими факторами для достижения БМО через 6 мес терапии.

У 14 (44%) из 32 пациентов зафиксированы НЯ любой степени, у 7 (22%) развились НЯ 3-4 степени (гематологические и негематологические НЯ у 6 (19%) и 1 (3%) больных соответственно).

Выводы. Асциминиб в дозах 80 и 400 мг в сутки продемонстрировал многообещающую эффективность и удовлетворительный профиль безопасности в когорте сильно предпоченных больных ХМЛ, и может рассматриваться в качестве терапевтической опции для пациентов с резистентностью или непереносимостью других ИТК.

Рыболовлева Т.Н., Трезубова Е.В., Сухорукова Э.Е., Минаева Н.В., Стрига Е.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

ПРОБЛЕМА ДИАГНОСТИКИ ГРИБОВ РОДА CANDIDA У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Введение. В последние годы у онкогематологических больных существенно возросло количество инфекций, вызванных грибами. Причиной является наличие у них иммунной недостаточности вследствие основного заболевания, применения иммуносупрессивных и антибактериальных препаратов. Возбудители нозокомиальных грибковых инфекций в большинстве случаев представляют собой дрожжеподобные грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* и др.). Источник инфекции - ротовая полость (орофарингеальный кандидоз), куда они попадают алиментарным путем. Начальные симптомы инфекций, вызванных *Candida*, смазаны, и только по мере прогрессирования заболевания они начинают проявляться клинически. Таким образом, для своевременной диагностики данного осложнения и назначения оптимального лечения необходима точная лабораторная диагностика.

Цель работы. Сравнить диагностическую значимость определения грибов рода *Candida* у онкогематологических больных с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов.

Материалы и методы. В качестве материала для исследований использовали мазок из ротоглотки, образцы мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и ликвора. Выявление молекулярно-генетических маркеров грибов *Candida* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией, используя набор реагентов «АмплиСенс *C. albicans* / *C. glabrata* / *C. krusei* -МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Для культивирования грибов использовали среды «OXOID» (Thermo Fisher Scientific, США). При бактериологическом исследовании применяли световую микроскопию (микроскоп Leica DM 500, Германия) с окраской по Граму и флуоресцентную микроскопию (микроскоп "Микромед-3 ЛЮМ" (ООО "Наблюдательные приборы", г. Санкт-Петербург) с окраской калькофлуором белым, предназначенную для выявления элементов грибов.

Результаты. Диагностика инфекций, вызванных *Candida* spp., проведена у 91 пациента с онкогематологическими заболеваниями (53 мужчины, 38 женщин). ДНК *Candida* была найдена у 19 (20,9 %) больных. При бактериологическом исследовании указанная инфекция выявлена у 14 (15,4 %) обследованных. Преобладающей в спектре возбудителей у онкогематологических больных являлась *C. albicans*. Реже - *C. glabrata* и *C. krusei*. Одновременное выявление возбудителей обоими лабораторными методами было в 8 (8,8 %) случаях. Обнаруженные отличия могут быть связаны с разной чувствительностью методов. Также может иметь значение и принцип используемых методов. При молекулярно-генетическом тестировании определяется ДНК патогена, и поэтому большое влияние на конечный результат оказывает качество экстракции нуклеиновых кислот из клинического материала. Бактериологический посев выявляет живые микроорганизмы, поэтому этот метод будет мало информативен при попадании в исследуемый биологический материал поврежденных клеток. Кроме того, эффективность определения грибов рода *Candida* может зависеть от вида используемого биоматериала. Так, например, в нашем исследовании при оценке БАЛ *Candida* spp. более эффективно выявлялись методом бактериологического посева.

Выводы. У онкогематологических больных установлена довольно высокая частота распространения инфекций, вызванных грибами *Candida* spp. При их диагностике метод ПЦР выявляет патоген несколько чаще, что может быть связано с большей чувствительностью метода и возможностью обнаружения ДНК инфекционного агента на ранних этапах развития инфекции. Бактериологические посева могут быть предпочтительнее при исследовании БАЛ. Таким образом, молекулярно-генетический и бактериологический методы являются взаимодополняющими и должны использоваться совместно при диагностике грибковых инфекций.

Сарпова М.В., Ванеева Е.В., Дьяконов Д.А., Росин В.А., Самарина С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА P53 С ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ БОЛЬНЫХ ДИФFUЗНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

Введение. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является одним из наиболее распространенных вариантов лимфопролиферативных неоплазий. Заболевание отличается вариабельностью клинических и биологических характеристик. По-

скольку эффективность стандартной терапии R-СНОР отмечена примерно у 60% пациентов, а в 20%-30% случаев регистрируются ранние рецидивы или рефрактерность к лечению, поиск новых прогностических маркеров для стратификации больных с ДВККЛ оста-

ется актуальным на сегодняшний день. Установлено, что важную роль в патогенезе, развитии резистентности к терапии и прогрессии многих типов лимфом, включая ДВККЛ, играет ген TP53. Его продукт, белок p53, является ключевым опухолевым супрессором. Он участвует в контроле клеточного цикла, осуществляет репарацию ДНК и апоптоз В-клеток в стрессовых условиях. К нарушению структуры и функций этого транскрипционного фактора приводят различные механизмы, в том числе абберации в хромосомном регионе 17p13, аномальное метилирование промотора p53, инактивация некоторых проапоптотических генов или гиперактивация антиапоптотических факторов. Литературные данные о прогностическом значении экспрессии белка p53 при ДВККЛ неоднозначны, что указывает на необходимость дальнейшего исследования.

Цель. Определить взаимосвязь иммуногистохимической экспрессии белка p53 с общей и беспрогрессивной выживаемостью больных ДВККЛ.

Материалы и методы. В исследование включены 75 пациентов (медиана возраста – 58 лет) с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, проходивших лечение в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2012 по 2019 гг. Все больные получали первую линию терапии по схеме R-СНОР. Подсчет относительного количества опухолевых элементов, экспрессирующих p53, проводили с помощью иммуногистохимического (ИГХ) и морфометрического методов на биопсийных образцах опухолевой ткани. Статистическую обработку данных выполняли, используя программное обеспечение STADIA. Пороговый уровень экспрессии

p53 в опухолевых клетках вычисляли с помощью ROC-анализа. Пятилетнюю общую (ОВ) и беспрогрессивную выживаемость (БПВ) рассчитывали по методу Каплана-Мейера с графическим построением соответствующих кривых (log-rank test). Риск наступления события вычисляли с помощью регрессионного анализа Кокса. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. По результатам ROC-анализа обнаружено, что пороговое значение ИГХ экспрессии p53-позитивных клеток соответствовало 43%. Согласно этому значению, всех обследуемых разделили на группы с высокой ($\geq 43\%$) и низкой ($< 43\%$) экспрессией белка. Высокая экспрессия p53 определена у 33 (44%) из 75 больных ДВККЛ. Пятилетняя ОВ пациентов с высоким содержанием p53-экспрессирующих клеток установлена значимо ниже, чем у обследуемых с подпороговым значением указанного маркера: 54,5% против 81,0% соответственно ($p = 0,014$). Риск летального исхода в 2,8 раза выше у больных ДВККЛ с надпороговой экспрессией p53 по отношению к пациентам с низким показателем ($p = 0,019$; HR=2,792; 95% ДИ=1,183-6,591). Пятилетняя БПВ больных при высокой экспрессии p53 значимо ниже, чем в группе с низким значением выраженности исследуемого маркера: 45,5% против 66,7% соответственно ($p = 0,022$). Риск развития рецидива и/или рефрактерности к терапии возрастал в 2,2 раза ($p = 0,027$; HR=2,203; 95% ДИ=1,094-4,439).

Выводы. Увеличение относительного количества p53-экспрессирующих опухолевых клеток ($\geq 43\%$) ассоциировано со снижением пятилетней общей и беспрогрессивной выживаемости больных ДВККЛ.

Солдатенкова О.В., Комиссаров К.А., Солдатенков В.Е., Минеева Н.В., Капустин С.И., Папаян Л.П., Сирина Н.Н., Четкин А.В

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

ТРОМБОФИЛИИ У ПАЦИЕНТОВ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РОССИИ: КЛАССИЧЕСКИЕ И ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА

Введение. Роль наиболее важных генетических факторов риска развития тромбоза, таких как мутация FV Leiden и мутация в гене протромбина G20210A, установлена. В настоящее время представляется необходимым продолжать поиск дополнительных факторов риска наследственной тромбофилии и соотношения их с классическими.

Цель. Изучить клинические и лабораторные особенности у пациентов с верифицированным тромбозом и наследственной тромбофилией и оценить дополнительные протромботические маркеры.

Материалы и методы. Была изучена 131 история болезни пациентов, проходивших лечение в Российском научно-исследовательском институте гематологии и трансфузиологии в период 2017-2021 годов. Критерий включения в исследование: верифицированный артериальный и/или венозный тромбоз и наличие подтвержденной наследственной тромбофилии. Критерий исключения: наличие мутаций в генах JAK2, CALR, MPL. На основании молекулярно-генетического тестирования, коагулологических ис-

следований были сформированы следующие группы пациентов (использовалась классификация тромбофилий по F.R. Rosendaal): I – изолированная мутация FV Leiden (n=20), II – изолированная мутация в гене протромбина G20210A (n=8), III – изолированный дефицит антитромбина (n=5), IV – изолированный дефицит протеина С (n=1), V – изолированная гиперактивность FVIII (n=19), VI – изолированная гипергомоцистеинемия (мутации в генах MTHFR, MTRR, подтвержденные фенотипически) (n=10), VII – изолированный первичный антифосфолипидный синдром (n=3), VIII – комбинация трех и более маркеров тромбофилии (n=9), IX – комбинация двух сильных маркеров тромбофилии (n=6), X – комбинация маркеров сильной и умеренной тромбофилии (n=50). Анализировались клинические и лабораторные данные в этих группах.

Результаты. Всего было обнаружено 208 маркеров сильной или умеренной тромбофилии (по F.R. Rosendaal). Наиболее часто встречалась гипергомоцистеинемия (27,88%).

Комбинированные тромбофилии были выявлены

у 49,62% пациентов. Наиболее частой комбинированной тромбофилией была комбинация мутации FV Leiden и гипергомоцистеинемии (26,15%).

Венозный тромбоз был найден у 70,77% пациентов, артериальный – у 15,38%, сочетание артериального и венозного тромбозов – у 13,85%.

Также у пациентов с наследственными тромбофилиями встречались атипичные локализации тромбоза, такие как яремная вена, почечная вена, поперечный, сагиттальный и сигмовидный синусы головного мозга.

У 29,77% пациентов тромбоз дебютировал жизнеугрожающим событием: у 20,61% - ТЭЛА (тромбоэмболия легочной артерии), 9,16% - ОНМК (острое нарушение мозгового кровообращения).

Мутация в гене F1 была найдена у 35,88% пациентов. Из них у 65,96% была верифицированная гиперфибриногенемия невоспалительного генеза.

Частота встречаемости группы крови В (III) была в 1,4 выше, чем в средней популяции.

Выводы. Мутация в гене F1, группа крови В (III) могут рассматриваться как дополнительные протромботические маркеры. Подтверждается значимость классических маркеров тромбофилии и их комбинации с вновь выявленными в популяции Северо-Западного региона России. Подтверждается важность тромбофилического скрининга как при венозных, так и при артериальных тромбозах.

Трегубова Е.В., Назарова Е.Л., Дьяконов Д.А., Минаева Н.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА

Введение. Лимфома Ходжкина (ЛХ) – это В-клеточное злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся выраженным реактивным полиморфноклеточным микроокружением, наличием в клетках Рид-Штернберга (РШ) нескольких aberrантно активированных путей в отсутствие рекуррентных хромосомных перестроек и с неоднозначным функциональным статусом гена TP53. Геномная нестабильность, наблюдаемая в трансформированных клетках, представлена двумя моделями: микросателлитной (MSI, microsatellite instability) и хромосомной. По мнению ряда авторов, MSI при гемобластозах участвует не в инициации опухолевого роста, а в его прогрессировании и в агрессивном характере течения новообразований, однако механизмы, лежащие в ее основе, до сих пор не известны. В настоящее время исследования MSI при ЛХ только начаты, при этом однозначных результатов не было получено.

Цель. Определить частоту выявления MSI при классической ЛХ (кЛХ) для оценки перспектив ее использования в качестве инструмента дифференциальной диагностики, раннего диагностического критерия, маркера прогрессирования, риска развития резистентности к стандартным линиям терапии или риска рецидива заболевания.

Материалы и методы. Проанализирован 31 образец опухолевой ткани больных с впервые диагностированной кЛХ, наблюдавшихся в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России на протяжении 24 мес. после постановки

диагноза. В качестве матрицы для исследования использовалась ДНК, выделенная из парафиновых блоков. Исследование MSI проводилось методом ПЦР с использованием набора реагентов «CorDIS MSI» (ООО «Гордиз», Россия) с последующим фрагментным анализом продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3500xL («Thermo Fisher Scientific», США).

Результаты. Частота встречаемости MSI при кЛХ составила 9,7% (3/31). Все случаи имели статус низкой микросателлитной нестабильности (MSI-L, low) (нестабильность одного локуса). Кроме того, проведено сопоставление результатов генетического тестирования с исходами терапии пациентов, пролеченных с использованием стандартных линий терапии кЛХ. В результате, во всех случаях обнаружение MSI (100%) было связано с прогрессированием заболевания или рецидивом, в то время как у больных без выявленной MSI неблагоприятные события отмечены лишь в 21,4% случаев (6/28) ($p=0,019$).

Выводы. Исходя из полученных данных, можно предположить, что присутствие MSI в клетках опухолевого клона оказывает негативное влияние на характер течения ЛХ, однако небольшой объем выборки не позволяет в полной мере оценить ее роль при данном заболевании. Необходим дальнейший детальный анализ более представительной выборки пациентов.

**Фаенко А.П., Голосова С.А., Иванова И.В., Клюева Е.А., Глазов Я.Н., Филиппова А.А.,
Малышева Д.С., Касаткин М.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Центр крови Федерального медико-биологического агентства", Москва

ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ IGG АНТИТЕЛ ПРОТИВ SARS-COV-2 У ДОНОРОВ ФГБУЗ ЦЕНТРА КРОВИ ФМБА РОССИИ

Введение. В период пандемии новой коронавирусной инфекции широкое распространение в терапии SARS-COV-2 получило назначение иммунной плазмы, полученной от доноров реконвалесцентов, которая использовалась как средство пассивной передачи противовирусных антител для быстрой активации иммунного ответа у заболевших. Предпосылками к использованию плазмы реконвалесцентов являлся успешный опыт крупных рандомизированных исследований по ее применению в отношении к вирусу Эбола, вирусу гриппа H1N1 и птичьего гриппа. В ФГБУЗ Центре крови ФМБА России (ЦК) с начала развития пандемии проводились исследования на выявление противовирусных антител к SARS-COV-2 с целью поиска потенциальных кандидатов на заготовку антиковидной плазмы.

Цель. Изучить частоту встречаемости маркеров IgG антител против SARS-COV-2 у доноров ФГБУЗ Центра крови ФМБА России.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное обсервационное исследование среди доноров крови ЦК с 28 апреля 2021 года по 07 сентября 2021 года. За этот период времени в ЦК проведено 26556 анализов на антитела класса IgG к SARS-COV-2 у 13561 доноров крови и ее компонентов, среди них 8167 - мужчин в возрасте $33,2 \pm 10,2$ лет и 5394 - женщин в возрасте $34,1 \pm 11$ лет. В период пандемии допуск доноров осуществлялся согласно приказам МЗ РФ по приему доноров крови и ее компонентов, в случае наличия перенесенной инфекции SARS-COV-2, донор мог быть допущен до донации через 1 месяц после закрытия больничного листа или через 1 месяц после постановки последней прививки. Исследования проводились на анализаторе ARCHITECT i2000sr (Abbott, США) с использованием реагентов ARCHITECT Anti-HBc II для качественного определения антител к ядерному антигену гепатита В (анти-HBc) в сыворотке и плазме крови человека (Abbott, США).

Результаты. За весь период наблюдения было получено 7785 положительных, 841 сомнительных и 17930 отрицательных тестов на антитела IgG против SARS-COV-2. При этом к концу срока наблюдения 5008 доноров были с положительным, 469 - с сомнительным

и 8084 - с отрицательным результатом исследования. По мере увеличения сроков развития пандемии доля положительных тестов на антитела IgG против SARS-COV-2 увеличивалась пропорционально основным периодом течения пандемии новой коронавирусной инфекции, что было обусловлено корреляцией $r=0,944$ (95% ДИ 0,843;0,981), $p<0,0001$ между нулевой точкой исследования, сроком наблюдения и результатом положительных тестов. Так, в начале исследования - апрель 2020 г., процент положительных тестов составил 9,45%, в ноябре 2020 г. достиг точки в 29,21%, в апреле 2021 г. - 34,08%, в период начала массовой вакцинации в июле 2021 г. был 58,91%, в конце исследования в сентябре 2021 г. - 74,77%. Встречаемость положительных анализов на антитела к SARS-COV-2 среди мужчин и женщин были одинаковы: 30,9% и 29,2% соответственно. Распространенность по группам крови также не отличалась от людей с отрицательным и составила для O(I) - 32,3%, A(II) - 36,8%; B(III) - 20,8%; AB(IV) - 10,1%, для резус-положительных - 79,1% и резус-отрицательных - 20,9%, Келл-положительных - 3,8% и Келл-отрицательных - 96,2%. При сравнительной оценке у исследуемых групп с целью оценки рисков выявления положительных маркеров на основные гемотрансмиссивных инфекций не было получено статистически значимых различий, за исключением молекулярно-биологических исследований к маркерам вирусного гепатита С, у лиц с положительными IgG антителами к SARS-COV-2 он встречался в 1,776 чаще (95% ДИ 1,008; 3,136), $p=0,047$, чем у лиц с отсутствием антиковидных антител.

Выводы. Проведенные популяционные исследования демонстрируют процесс формирования коллективного иммунитета к новой коронавирусной инфекции среди потенциально здоровых людей, допущенных до сдачи крови или ее компонентов. Однако увеличение частоты, по-видимому, ложноположительных результатов на маркер гепатита С, вызывает опасения, связанные с потерей донорских кадров, возможно стоит предусмотреть механизм дополнительного восстановления у данной категории доноров, необходимы дальнейшие исследования.

Фаенко А.П., Голосова С.А., Иванова И.В., Клюева Е.А., Глазов Я.Н., Филиппова А.А.,
Малышева Д.С., Касаткин М.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Центр крови Федерального медико-биологического агентства", Москва

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА АНТИ-НВСОРЕ У ДОНОРОВ ФГБУЗ ЦЕНТРА КРОВИ ФМБА РОССИИ

Введение. Достижения в области молекулярно-биологических (ПЦР тестирование) и иммунологических исследований (ИФА/ИХЛА тестирование) образцов крови за последние десятилетия значительно снизили риск передачи вируса гепатита В (ВГВ) при трансфузии донорской крови и ее компонентов. Однако специфический остаточный риск, по-прежнему, связан с чрезвычайно низкими уровнями вирусной ДНК у доноров крови со скрытым течением инфекции ВГВ, которые могут не обнаруживаются даже с помощью высокочувствительных индивидуальных постановок ПЦР тестирования. Модели исследований, основанные на клинических и экспериментальных данных, оценивают остаточный риск передачи инфекции в 3-14%, связанный с заготовкой крови и ее компонентов от доноров с occultным течением ВГВ. В связи с этим введение тестирования на анти-НВсоре в службе крови может улучшить инфекционную безопасность донорской крови и ее компонентов.

Цель. Оценить частоту встречаемости маркеров анти-НВсоре у доноров ФГБУЗ Центра крови ФМБА России (ЦК) в условиях современного нормативно-правового поля. Материалы и методы. Проведено ретроспективное обсервационное исследование среди доноров крови ЦК с 18 февраля 2021 года по 09 сентября 2021 года. За этот период времени ЦК посетило 10589 доноров, осуществлено 17196 донаций крови и ее компонентов. Исследования проводились на анализаторе ARCHITECT i2000sr (Abbott, США) с использованием реагентов ARCHITECT Anti-НВс II.

Результаты. За период 203 дней наблюдения было проведено 157 исследований на анти-НВсоре (0,91% от исследования всех образцов крови) у 155 доноров крови и ее компонентов (1,46% от всех доноров). Получено 12 положительных и 145 отрицательных результатов. Среди доноров с положительным результатом исследования на анти-НВсоре – 11 составил мужчины в возрасте 41,6±8,7 лет и 1 женщина в возрасте 33 лет. Из них первичных доноров было 3 (25%), повторных активных доноров – 9 (75%), сдавших 305 раз кровь и ее компоненты. При оценке социального статуса – 4 донора относятся к офисным работникам (33,33%), 2 в сфере образования (16,67%), 2 были без работы (16,67%), по одному в сфере медицины (8,33%), спорта (8,33%), промышленного производства (8,33%) и городского транспорта (8,33%). В отличие от проведения исследований на другие инфекционные маркеры, где исследования проводятся при каждой донации крови и ее компонентов или обследовании, необходимость в исследовании анти-НВсоре у доноров крови и ее ком-

понентов определены особыми условиями согласно приложению №4 приказа МЗ РФ №1166н от 28.10.2020 г. Среди данных условий можно выделить три группы. Первая группа включает исследование на анти-НВсоре в случае получения сомнительного результата повторного иммунологического исследования на маркеры вируса гепатита В НВsAg. В данной группе не было получено положительных результатов на анти-НВсоре при этом 4 результата были отрицательны. Вторая группа - в случае осуществления сероконтрольных исследований не ранее чем через 120 календарных дней независимо от того, маркеры какого возбудителя были выявлены при первичном исследовании. При заданном условии было получено 2 положительных и 24 отрицательных результата на анти-НВсоре, т.е. риск выявления анти-НВсоре в заданном условии составляют 7,7%. Третья группа включала лиц в случае невыявления положительного образца при индивидуальном исследовании на наличие вирусов иммунодефицита человека, гепатитов В и С образцов крови, ранее входивших в минипул, проводится повторное индивидуальное исследование образцов крови доноров, а также дополнительное исследование образцов крови, ранее входивших в минипул, на наличие анти-НВсоре. На эту группу приходилось самое большое количество исследований, из которых 10 были с положительным и 117 с отрицательным результатом исследования на анти-НВсоре, риск выявления анти-НВсоре составил 7,9%. У 3 доноров крови с положительным результатом исследования на анти-НВсоре были получены положительные реакции на маркеры других инфекционных заболеваний – гепатита С, ВИЧ и сифилиса. В структуре постоянных медицинских противопоказаний для сдачи крови и ее положительный результат на анти-НВсоре составил 8,16%.

Выводы. Введение нового метода исследования на анти-НВсоре демонстрирует высокую частоту его встречаемости среди доноров крови ЦК, несмотря на небольшой охват исследований среди всех доноров – 1,46%. Высокий процент встречаемости анти-НВсоре среди активных доноров крови вызывает опасения по поводу потери донорских кадров после внедрения данного метода исследования в случае каждой донации и, как следствие, увеличение эпидемиологической контроля в сфере распространения ВГВ. В тоже время данная мера является дополнительным шагом на пути повышения инфекционной безопасности донорской крови и ее компонентов.

Чеботарев Д.И., Ковригина А.М., Меликян А.Л., Кузьмина Л.А

ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА И ТРАБЕКУЛЯРНОЙ КОСТИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМ МИЕЛОФИБРОЗОМ

Введение. Первичный миелофиброз (ПМФ) – клональное заболевание из группы Ph-негативных миело-пролиферативных заболеваний, характеризующееся нарушениями клеточной структуры, гистоархитектоники и стромы костного мозга. Медикаментозная терапия, в том числе с использованием селективных ингибиторов JAK2-тирозинкиназы, оказывает сдерживающее воздействие, в то время как трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является радикальным методом терапии данного заболевания.

Цель. Охарактеризовать изменения клеточной структуры и стромы кроветворной ткани, трабекулярной кости при алло-ТГСК у больных фиброзной стадией первичного миелофиброза.

Материалы и методы. Исследование проведено на базе ФБГУ НМИЦ гематологии МЗ РФ. Исследован материал 24 трепанобиоптатов, полученных в динамике у 9 пациентов с ПМФ и алло-ТГСК, в периоды: I – за 1 месяц до алло-ТГСК, II – через 1-3 месяца и III – через 4-6 месяцев после алло-ТГСК. Исследование проводилось с использованием гистохимических окрасок гематоксилином и эозином, серебром по Гомори, «Трихром по Массону». 3/9 пациентов перед алло-ТГСК получали циторедуктивную терапию препаратами IFN α и/или гидроксимочевины; 6/9 пациентам в программу предтрансплантационной терапии были включены препараты ингибиторов JAK2.

Результаты. В предтрансплантационном (I) периоде в трепанобиоптатах костного мозга пациентов отмечалась гетерогенность морфологической картины, что позволило выделить 3 морфологических варианта.

В посттрансплантационных (II, III) периодах (в те-

чение 6 месяцев после алло-ТГСК) в связи с изменениями клеточности кроветворной ткани, стромы и костных балок, обусловленными алло-ТГСК, выделенные морфологические варианты не прослеживались.

При исследовании трепанобиоптатов костного мозга во II и III посттрансплантационных периодах выявлен регресс миелофиброза и остеосклероза. Так, степень ретикулинового фиброза MF-3 в I периоде была диагностирована у 78% пациентов, к 6-му месяцу посттрансплантационного периода – ни у одного пациента. В I периоде остеосклероз grade 2 и 3 составлял соответственно 22% и 44%, в то время как к 6 мес. посттрансплантационного периода не превышал grade 1. Во II и III пост-трансплантационных периодах обнаружены признаки восстановления нормального цикла перестройки кости. В восстановление клеточности ростков миелопоэза отмечалась гетерогенность: к 3 месяцу восстанавливался эритроидный росток, в то время как восстановление гранулоцитарного ростка – к 6 месяцу; полноценного восстановления клеточности мегакариоцитарного ростка к 6 месяцу не отмечалось.

Выводы. Восстановление клеточности ростков миелопоэза опережает восстановление показателей крови, что может быть связано с индуцированной миелодисплазией или нарушением стромальных ниш. У всех пациентов с ПМФ после алло-ТГСК в посттрансплантационных периодах (1-6 месяцев) достигнута морфологическая ремиссия, что не было отмечено у пациентов, получавших только медикаментозную терапию, в том числе, с включением ингибиторов JAK2 в программу терапии.

Шатилова А.А., Гиршова Л.Л., Будаева И.Г., Зайцев Д.В., Миролюбова Ю.В., Петухов А.В., Силонов С.А., Богданов К.В., Никулина Т.С., Моторин Д.В., Иванов В.В., Алексеева Ю.А., Зарицкий А.Ю.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А.Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МУТАЦИИ DNMT3A СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой гетерогенное злокачественное новообразование, характеризующееся инфильтрацией костного мозга клональными клетками-предшественниками гемопоэза. Мутация в гене DNMT3A встречается в 13-20% случаев ОМЛ, приводя к aberrантному метилированию генов, ответственных за апоптоз и самообновление стволовых гемопоэтических клеток, однако прогностическая значимость данной мутации остается не до конца ясной.

Цель. Оценить частоту встречаемости и влияние на прогноз мутации гена DNMT3A в изолированном варианте и в сочетании с другими генетическими aberrациями.

Материалы и методы. В исследование было включено 116 пациентов с впервые выявленным ОМЛ, доля мужчин среди которых составила 51% (59/116), а женщин – 49% (57/116). 55% пациентов (64/116) были первично обследованы в ФГБУ «НМИЦ им.В.А.Алмазова, 45% (52/116) образцов костного мозга были получены из различных регионов РФ. Медиана возраста пациентов составила 51 год (от 18 до 84 лет). Согласно критериям ELN-2017 определить цитогенетическую группу риска в дебюте заболевания оказалось возможным у 78% (90/116) пациентов: 19% (19/90) были отнесены к благоприятной группе риска, 36% (32/90) – к промежуточной и 43% (39/90) – к неблагоприятной. Вид индукционной полихимиотерапии был известен у 95% (110/116) пациентов: стандартный индукционный режим «7+3» был проведен у 64,5% (71/110), режимы с включением высоких доз цитозара (“HiDAC”, “FLAG+/-Ida”) – у 9% (10/110), неинтенсивные режимы терапии (низкие дозы цитозара, гипометилирующие агенты) – у 18% (20/110), часть пациентов (3%, 3/110) имели неадекватную предлеченность, остальные пациенты (5,5%, 6/110) были направлены на паллиативное лечение. По показаниям 35% (41/116) пациентов перешли на этап аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови.

Для определения мутационного статуса гена DNMT3A использовали геномную ДНК с дальнейшим проведением прямого секвенирования по Сэнгеру на приборе Applied Biosystems 3500xL. Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ Microsoft Excel и SPSS Statistics 26.0.

Результаты. Мутация DNMT3A R882 была выявлена у 13% (15/116) пациентов и встречалась оди-

наково часто во всех возрастных группах. Мутация в гене DNMT3A была ассоциирована с нормальным кариотипом ($p=0.025$) и не имела прочной связи с цитогенетической группой риска ($p>0.05$). У пациентов с мутированным геном DNMT3A не было выявлено достоверного увеличения частоты встречаемости мутаций NPM1, FLT3-ITD и FLT3-TKD, а также других мутаций генов эпигенетической регуляции (IDH1/2, ASXL1) ($p>0.05$). В дальнейший анализ были включены пациенты, получившие стандартную цитостатическую терапию с целью индукции ремиссии в дебюте заболевания («7+3», «HiDAC», «FLAG+/-Ida»). Полная ремиссия (ПР) была достигнута у 73% (11/15) пациентов с мутированным геном DNMT3A. Мутация DNMT3A в изолированном варианте и в сочетаниях с мутациями NPM1 и FLT3-ITD не оказывала достоверного влияния на частоту достижения ПР и вероятность развития раннего рецидива (<12 мес.) ($p>0.05$). Частота достижения ПР была статистически значимо выше ($p=0.044$) в группе благоприятного цитогенетического риска по сравнению с группами промежуточного и неблагоприятного риска, при этом мутированный статус DNMT3A не влиял на частоту достижения ПР ($p>0.05$). В группе пациентов с нормальным кариотипом мутированный статус DNMT3A не оказывал статистически значимого влияния на частоту достижения ПР и вероятность развития раннего рецидива, а также не ухудшал показатели безрецидивной выживаемости (БРВ) ($p>0.05$). Тем не менее, пациенты с нормальным кариотипом и диким типом DNMT3A имели лучшие показатели общей выживаемости (ОВ), по сравнению с пациентами с мутацией гена DNMT3A ($p=0.012$).

Выводы. Мутация гена DNMT3A ассоциирована с нормальным кариотипом, встречается одинаково часто во всех возрастных группах и цитогенетических группах риска, не имеет прочной ассоциации с мутациями в генах NPM1, FLT3-ITD, FLT3-TKD, IDH1/2, ASXL1 и не влияет на частоту достижения ПР, вероятность развития раннего рецидива и БРВ как в изолированном варианте, так и в сочетаниях с другими генетическими aberrациями в общей группе пациентов. Несмотря на это, рекомендуется проводить оценку мутационного статуса гена DNMT3A в дебюте заболевания в связи с отрицательным влиянием мутации DNMT3A на показатели ОВ у пациентов промежуточной цитогенетической группы риска с нормальным кариотипом.