

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Инвазивный аспергиллез: результаты
многоцентрового исследования**

**Здоровье детей, родившихся у женщин
после лечения лимфомы Ходжкина**

**Национальные клинические рекомендации
по диагностике и лечению
пароксизмальной ночной гемоглобинурии**

**Факторы риска реактивации
цитомегаловирусной инфекции у детей
и подростков после различных
видов алло-ТГСК**

2

Двойной удар по болезни

Зарегистрировано
новое показание
для Рибомустина –
лечение
Множественной
Миеломы⁸

- Уникальный двойной механизм действия: алкилирующий агент и антиметаболит¹
- Высокая эффективность в первой линии терапии ХЛЛ^{*2,3}
- Более эффективная и безопасная альтернатива СНОР в первой линии терапии индолентных НХЛ^{*4}
- Высокая частота ремиссий даже у предлеченных пациентов с индолентными НХЛ*, в том числе рефрактерных к ритуксимабу⁵⁻⁷
- Хорошая переносимость даже у предлеченных пациентов^{5,7}

Ссылки:

1. Gandhi V, Semin Oncol 2002; 29:4-11
2. Knauf W. et al., J Clin Oncol 2009; 27(26):4378-4384
3. Fischer K. et al., Blood 2009; 114:Abst #205

4. Rummel MJ et al., Blood 2009; 114:Abst #405
5. Friedberg et al., J Clin Oncol 2008
6. Rummel MJ et al., J Clin Oncol 2005;23:3383-9

7. Cheson BD et al., Blood 2009; 114:Abst #2681
8. Инструкция по медицинскому применению препарата Рибомустин ЛСР-006546/10-191113

* ХЛЛ – хронический лимфолейкоз
НХЛ – неходжкинские лимфомы

Представительство компании «Астеллас Фарма Юроп Б.В.» (Нидерланды), г. Москва 109147, г. Москва, ул. Марксистская, 16, тел.: +7 (495) 737-07-55; 737-07-56; факс: +7 (495) 737-07-57

Перед назначением, пожалуйста, ознакомьтесь с полной инструкцией по медицинскому применению препарата Рибомустин РУ ЛСР-006546/10 от 08.07.2010 RUS/BEN/12.2013/3000/Borges/1247 Реклама



Рибомустин
бендамустин

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Аспергиллёз

Фузариоз

Устойчивый к флуконазолу

инвазивный кандидоз

Кандидемия

у пациентов без нейтропении

Сцедоспориоз

Инвазивный аспергиллёз занимает 1-е место в структуре ИГИ* у детей с онкогематологическими заболеваниями¹

- Вифенд – уровень рекомендаций А1 при инвазивном аспергиллёзе у детей (ЕСIL 4 для педиатрических пациентов, 2012 г.)²
- Наличие у Вифенда инфузионной и пероральных форм предоставляет возможность проведения ступенчатой терапии (лиофилизат для в/в 200мг, суспензия 40мг/мл, таб. 200мг)³



*ИГИ - инвазивные грибковые инфекции

Краткая информация по применению препарата Вифенд®

Международное непатентованное название: вориконазол
Фармакотерапевтическая группа: противогрибковый препарат системного применения

Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, порошок для приготовления суспензии для приема внутрь

Фармакологические свойства: Вориконазол – противогрибковый препарат широкого спектра действия из группы триазолов, его механизм действия связан с ингибированием деметилирования 14α-стерола опосредованного грибовыми цитохромом Р450 – ключевое звено биосинтеза эргостерола. *In vitro* обладает широким спектром противогрибкового действия: активен в отношении *Candida* spp. (включая штаммы *C. krusei*, устойчивые к флуконазолу, и резистентные штаммы *C. glabrata* и *C. albicans*), а также проявляет фунгицидный эффект в отношении всех изученных штаммов *Aspergillus* spp. и патогенных грибов, ставших актуальными в последнее время, включая *Scedosporium* spp. и *Fusarium* spp., которые ограниченно чувствительны к существующим противогрибковым средствам.

Показания к применению
- Инвазивный аспергиллёз.
- Кандидемия у пациентов без нейтропении.
- Тяжелые инвазивные кандидозные инфекции (включая *C. krusei*).
- Кандидоз пищевода.
- Тяжелые грибковые инфекции, вызванные *Scedosporium* spp. и *Fusarium* spp.
- Другие тяжелые инвазивные грибковые инфекции при непереносимости или рефрактерности к другим лекарственным средствам.

- Профилактика «прорывных» грибковых инфекций у пациентов со сниженной функцией иммунной системы, миелорадой и нейтропенией, из группы высокого риска (рецидивы трансплантации гемологических стволовых клеток, больные с рецидивом лейкоза).
- Профилактика инвазивных грибковых инфекций у пациентов группы высокого риска, таких как рецидивы трансплантации гемологических стволовых клеток.

Противопоказания: Вифенд противопоказан больным с гиперчувствительностью к вориконазолу или любому другому компоненту препарата. Противопоказано одновременное применение Вифенда и следующих препаратов: субстраты изофермента CYP3A4 – терфенадин, астемизол, цизаприд, пимозид или хинидин; сиромимус; рифампицин, карфамазепил и длительно действующие барбитураты (фенобарбитал); рифабутин; эфавиренс в высоких дозах (400 мг и выше один раз в сутки); ритонавир (400 мг и выше два раза в сутки); анкаквины спорыньи (эрготамин, дигидроэрготамин) являющиеся субстратами изофермента CYP3A4; зверобой продырявленный (индуктор цитохрома P450 и P-гликопротеина).

Вифенд противопоказан детям в возрасте младше 2 лет. А также при дефиците сахаразы/изомилазы, непереносимости фруктозы, глюкозогалактозной мальабсорбции.

Осторожность: Повышенная чувствительность к другим препаратам – производным азолов. Тяжелая степень недостаточности функции печени, тяжелая степень недостаточности функции почек. Электролитные нарушения, такие как: гипокалиемия, гипомгниемия и гиполокальциемия. Сахарный диабет. Вориконазол следует применять с осторожностью у пациентов с проаритмическими состояниями: врожденное или приобретенное удлинение интервала QT, кардиомиопатия, в особенности с сердечной недостаточностью; синусовая брадикардия; наличие симптоматической аритмии; одновременный прием препаратов, вызывающих удлинение интервала QT.

Способ применения и дозы: Назначение Вифенда следует начинать с внутривенного введения в рекомендуемой насыщающей дозе, чтобы уже в первый день добиться адекватной концентрации в плазме крови. Внутривенное введение следует продолжать как минимум 7 дней, после чего возможен переход на пероральный прием препарата, при условии, что пациент способен принимать лекарственные средства для приема внутрь. Взрослые и подростки от 12 лет до 18 лет: в первые сутки по 6 мг/кг каждые 12 часов (насыщающая доза), далее по 3-4 мг/кг каждые 12 ч (поддерживающая доза). Дети от 2 до 12 лет и подростки от 12 до 14 лет с массой тела менее 50 кг: в первые сутки 9 мг/кг 2 раза (насыщающая доза), далее по 8 мг/кг каждые 12 часов (поддерживающая доза).

Побочное действие: Наиболее распространенными нежелательными реакциями являются зрительные нарушения, лихорадка, сыпь, рвота, тошнота, диарея, головная боль, периферические отеки и боль в животе. Нежелательные реакции обычно легко или умеренно выражены. Зрительные нарушения (затуманивание зрения, изменение цветового зрения или фотообоя) являются преходящими и полностью обратимыми; в большинстве случаев они исчезают спонтанно в течение 60 мин. Во время лечения могут развиться нарушения функции печени (токсической гепатит, печеночная недостаточность).

Взаимодействие с лекарственными препаратами. Вориконазол метаболизируется под действием изофермента цитохрома P450. Ингибиторы или индукторы этих изоферментов могут вызвать соответственно повышение или снижение концентраций вориконазола в плазме крови.

Полная информация по препарату Вифенд содержится в инструкции по медицинскому применению

Список литературы

1. Meirav Mor, Gil Gilad, Liora Kornreich, et al. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:1092–1097 2. ECIL 4 – *Pediatric Group Considerations for Fungal Diseases and Antifungal Treatment in Children*, 2012 (<http://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/ECIL/4/Documents/ECIL%204%202011%20Paediatric%20Guidelines%20Fungi%20and%20antifungals.pdf>) 3. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Вифенд®. Регистрационные номера: П № 015539; П № 015540; ЛП-002080.



ООО «Пфайзер», Россия, 123317, Москва, Пресненская наб., д. 10, БЦ «Башня на Набережной» (Блок С) Тел.: +7 (495) 287 50 00. Факс: +7 (495) 287 53 00.

Эффективность, когда это особенно необходимо



WRUVEAD14006



РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ с международным участием «ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ЛИМФОМЫ»

23-24 октября 2014 г.

Гостиница «Холидей Инн Сокольники»

От имени Российского общества онкогематологов и лично профессора И.В. Поддубной мы рады пригласить Вас принять участие в XI Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы», которая состоится 23–24 октября 2013 г. в Москве.

Председатели конференции – член-корр. РАМН, проф. И.В. Поддубная (Россия), проф. Julie M. Vose (США) и проф. Ulrich Jäger (Austria). Конференция проводится совместно с Европейской гематологической ассоциацией (ЕНА).

ВЫСТУПЛЕНИЯ

крупнейших отечественных и зарубежных специалистов в области диагностики и лечения злокачественных лимфопролиферативных заболеваний.

ПОСТЕРНАЯ СЕССИЯ

Принять участие могут все специалисты в области онкологии и гематологии.

Мы приглашаем Вас принять участие!

Регистрация на конференцию и подробная информация на сайте

www.MED4SHARE.ru



Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOHEMATOLOGY

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

проф., д.м.н. Е.В. Самочатова
Заместители главного редактора
проф., д.м.н. В.В. Птушкин,
проф., д.м.н. Б.В. Афанасьев
Ответственный секретарь
д.м.н. Ю.В. Румянцева

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

проф., д.м.н. О.В. Алейникова (Минск)
проф., д.м.н. А.К. Голенков (Москва)
проф., д.м.н. А.И. Карачунский (Москва)
д.м.н. Е.Н. Паровичникова (Москва)
проф., д.м.н. Ю.А. Криволапов (С.-Петербург)
доц., д.м.н. М.Л. Минков (Австрия)
д.м.н. Н.В. Мякова (Москва)
к.м.н. Е.А. Никитин (Москва)
проф., д.м.н. О.А. Рукавицын (Москва)
проф., д.м.н. С.А. Румянцев (Москва)
д.м.н. Л.П. Менделеева (Москва)
к.м.н. Л.Г. Фечина (Екатеринбург)
д.м.н. А.Л. Усс (Минск)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

проф., д.м.н. Е.А. Лукина (Москва)
чл.-корр. РАМН И.В. Поддубная (Москва)
чл.-корр. РАМН А.Г. Румянцев (Москва)
к.м.н. В.А. Россиев (Самара)
проф., д.м.н. А.Г. Талалаев (Москва)

EDITOR-IN-CHIEF

Prof. Ye.V. Samochatova
Deputy Editors
Prof. V.V. Ptushkin,
Prof. B.V. Afanasiev
Executive Secretary
D. Sci. Yu.V. Rumyantseva

EDITORIAL BOARD

Prof. O.V. Aleynikova (Minsk)
Prof. A.K. Golenkov (Moscow)
Prof. A.I. Karachunskiy (Moscow)
D. Sci. Ye.N. Parovichnikova (Moscow)
Prof. Yu.A. Krivolapov (St.-Petersburg)
D. Sci. M.L. Minkov (Austria)
D. Sci. N.V. Myakova (Moscow)
PhD Ye.A. Nikitin (Moscow)
Prof. O.A. Rukavitsyn (Moscow)
Prof. S.A. Rumyantsev (Moscow)
D. Sci. L.P. Mendeleeva (Moscow)
PhD L.G. Fechina (Yekaterinburg)
D. Sci. A.L. Uss (Minsk)

EDITORIAL COUNCIL

Prof. Ye.A. Lukina (Moscow)
Prof. I.V. Poddubnaya (Moscow)
Prof. A.G. Rumyantsev (Moscow)
PhD V.A. Rossiyeв (Samara)
Prof. A.G. Talalayev (Moscow)

О с н о в а н в 2 0 0 5 г.

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
www.abvpress.ru
e-mail: abv@abvpress.ru

Заведующая редакцией Т.В. Клюковкина
Корректор В.В. Калинина
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19
e-mail: baza@abvpress.ru
Служба рекламы
В.А. Клюковкин, +7 (499) 929-96-19
e-mail: gm@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
ПИ №ФС77-36928 от 21 июля 2009 г.

При полной или частичной перепечатке
материалов ссылка на журнал
«Онкогематология» обязательна.

Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.

В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.

ISSN 1818-8346
Онкогематология. 2014. № 2. 1–76
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2014

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 42167

Отпечатано в типографии
ООО «Графика»

Тираж 3000 экз.



2014

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

А.А. Даниленко, С.В. Шахтарина, Л.Н. Щелконогова, В.В. Павлов

Здоровье детей, родившихся у женщин после лучевого, химио- и химиолучевого лечения лимфомы Ходжкина	6
--	----------

Н.Н. Климко, О.В. Шадривова, С.Н. Хостелиди, Е.А. Десятник, Ю.В. Борзова, Р.М. Чернопятова, Е.В. Шагдилеева, А.Г. Волкова, М.О. Попова, И.С. Зюзгин, О.С. Ружинская, О.Е. Рябыкина, Н.В. Медведева, А.С. Колбин, Э.Г. Бойченко, Т.С. Богомолова, С.М. Игнатъева, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев

Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования	13
--	-----------

А.Д. Кулагин, И.А. Лисуков, В.В. Птушкин, Е.Р. Шилова, Н.В. Цветаева, Е.А. Михайлова

Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии	20
---	-----------

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

В.А. Лавриненко, Т.В. Савицкая, Е.В. Волочник, Ю.Е. Марейко, О.В. Алейникова

Количественный анализ химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярно-генетическими методами	29
--	-----------

Н.В. Жуков, А.Л. Усс, Н.Ф. Миланович, В.В. Птушкин, Б.В. Афанасьев, Н.Б. Михайлова, В.Б. Ларионова, Е.А. Демина, Н.Г. Тюрина, М.А. Вернюк, Е.Е. Караманешт, А.Г. Румянцев

Оптимальные сроки проведения аутологичной трансплантации клеток предшественников гемопоэза при неблагоприятном течении лимфомы Ходжкина. Зарубежные рекомендации и отечественная практика	37
--	-----------

С.Н. Ширяев, Н.В. Станчева, Е.В. Морозова, И.М. Бархатов, М.Ю. Аверьянова, С.В. Разумова, О.В. Голощапов, А.Б. Чухловин, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев

Факторы риска реактивации цитомегаловирусной инфекции у детей и подростков после различных видов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток	45
--	-----------

ФАРМАКОТЕРАПИЯ

В.И. Захаревич, В.В. Дмитриев

Фармакокинетика колистина и расчет суточной дозы колестиметата натрия у детей с химиоиндуцированной нейтропенией	53
---	-----------

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Л.Л. Головкина

Генетическая рестрикция гуморального иммунного ответа	58
--	-----------

От редакции	64
--------------------------	-----------

М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова

Образовательная лекция. Тромбоциты и гемостаз	65
--	-----------

ПРЕСС-РЕЛИЗ

Европейский комитет по лекарственным препаратам для человека (СНМР) рекомендует утвердить в ЕС препарат Газива компании Рош для пациентов с хроническим лимфолейкозом	74
--	-----------

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

<i>A.A. Danilenko, S.V. Shakhtarina, L.N. Shchelkonogova, V.V. Pavlov</i> Health of children born to women after radiation and chemotherapy for Hodgkin's lymphoma	6
<i>N.N. Klimko, O.V. Shadrivova, S.N. Khostelidi, E.A. Desyatik, Yu.V. Borzova, R.M. Chernopyatova, E.V. Shagdileeva, A.G. Volkova, M.O. Popova, I.S. Zyuzgin, O.S. Ruzhinskaya, O.Ye. Ryabykina, N.V. Medvedeva, A.S. Kolbin, E.G. Boychenko, T.S. Bogomolova, S.M. Ignatieva, L.S. Zubarovskaya, B.V. Afanasiev</i> Invasive aspergillosis: results of multicenter study	13
<i>A.D. Kulagin, I.A. Lisukov, V.V. Ptushkin, Ye.R. Shilova, N.V. Tsvetaeva, Ye.A. Mikhailova</i> National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	20

HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

<i>V.A. Lavrinenko, T.V. Savitskaya, Ye.V. Volochnik, Yu.E. Mareiko, O.V. Aleynikova</i> Quantitative analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with molecular genetic methods	29
<i>N.V. Zhukov, A.L. Uss, N.F. Milanovich, V.V. Ptushkin, B.V. Afanasiev, N.B. Mikhaylova, V.B. Larionova, E.A. Demina, N.G. Tyurina, M.A. Vernyuk, E.E. Karamanesht, A.G. Rummyantsev</i> The optimal time for autologous hematopoietic progenitor cell transplantation during treatment of Hodgkin's lymphoma. Foreign recommendations and russian experience	37
<i>S.N. Shiriaev, N.V. Stancheva, Ye.V. Morozova, I.M. Barkhatov, M.Yu. Averianova, S.V. Razumova, O.V. Goloshchapov, A.B. Chukhlovin, L.S. Zubarovskaya, B.V. Afanasiev</i> Risk factors of CMV replication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents	45

PHARMACOTHERAPY

<i>V.I. Zakharevich, V.V. Dmitriev</i> Colistine pharmacokinetics and Colistimethate sodium daily dose calculation in children with chemotherapy induced neutropenia	53
--	-----------

BASIC RESEARCH IN PRACTICAL MEDICINE TODAY

<i>L.L. Golovkina</i> Genetic restriction of humoral immune response	58
From edition	64
<i>M.A. Pantelev, A.N. Sveshnikova</i> Educational lecture. Platelets and hemostasis	65

PRESS RELEASE

CHMP recommends EU approval of Roche's Gazyva™ for people with chronic lymphocytic leukemia	74
--	-----------

Здоровье детей, родившихся у женщин после лучевого, химио- и химиолучевого лечения лимфомы Ходжкина

А.А. Даниленко, С.В. Шахтарина, Л.Н. Щелконогова, В.В. Павлов

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, Обнинск

Контакты: Анатолий Александрович Даниленко danilenko@mrrc.obninsk.ru

Представлены данные, касающиеся состояния здоровья 411 детей (I поколение), родившихся у 340 женщин после лучевого, химио- и химиолучевого лечения лимфомы Ходжкина (ЛХ), и 23 детей II поколения. Установлено, что большинство детей родились здоровыми. Врожденная патология зарегистрирована у 19 (14,6 %) детей I поколения и у 1 (4,3 %) ребенка II поколения. У 3 детей I поколения развилась ЛХ.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, дети, здоровье

Health of children born to women after radiation and chemotherapy for Hodgkin's lymphoma

A.A. Danilenko, S.V. Shakhtarina, L.N. Shchelkonogova, V.V. Pavlov

Medical Radiological Research Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk

Presents data of the health of 411 children (I generation) and 23 children (II generation) born to 340 women received chemotherapy or radiotherapy due to Hodgkin's lymphoma. Most children were born healthy. Congenital pathology were registered in 19 (14.6 %) children of I generation and 1 (4.3 %) – of II generation. In 3 children of I generation Hodgkin's lymphoma was diagnosed.

Key words: Hodgkin's lymphoma, delivery, children

Введение

Большинство женщин, больных лимфомой Ходжкина (ЛХ), ко времени установления диагноза находятся в детородном возрасте. Среди первичных пациенток с ЛХ, получивших лечение в Медицинском радиологическом научном центре (МРНЦ), женщины моложе 40 лет составили 90 %, моложе 30 лет – 75 % [1]. В связи со значительным улучшением выживаемости пациентов с ЛХ, в том числе безрецидивной, возникает озабоченность качеством их жизни после лечения. Учитывая, что многие женщины ко времени установления диагноза «лимфома Ходжкина» еще не имеют детей, сохранение фертильности и возможность иметь потомство после лечения имеют для них существенное значение как составляющие качества жизни. Кроме того, важно знать о состоянии здоровья детей, родившихся у женщин после лечения ЛХ.

Сведения о здоровье детей, рожденных женщинами после лечения ЛХ, в литературе весьма ограничены. Большинство относительно редких сообщений о количестве рожденных детей [2–4] не сопровождаются сведениями о выборке пациентов, а состояние здоровья родившихся детей оценивалось только при рождении. Кроме того, исследованные когорты значительно ограничены количественно.

Цель исследования – оценить состояние здоровья детей, родившихся у женщин после лучевого, химио- и химиолучевого лечения ЛХ.

Материал и методы

С целью исключения непосредственного влияния цитостатиков на развитие плода и течение беремен-

ности в исследование включены только женщины, беременность у которых наступила после окончания лечения. Этому критерию соответствовало 340 женщин, получивших лечение ЛХ в МРНЦ, имевших впоследствии беременность, завершившиеся родами. Женщины во время лечения ЛХ были в возрасте от 14 до 35 лет (медиана – 20 лет). Противоопухолевое лечение осуществлялось в промежутке времени с 1970 по 2011 г. в соответствии с методами, применявшимися в течение определенных методологических этапов лечения. Распределение женщин в соответствии со стадией ЛХ и программой лечения представлено в табл. 1. Ранние стадии ЛХ (I, II) диагностированы у 241 (70,9 %), поздние (III, IV) – у 99 (29,1 %) пациенток. Симптомы интоксикации были у 110 (32 %) больных.

Гормональная защита яичников в процессе химиотерапии (ХТ) не проводилась.

Лечение пациенток состояло из лучевой (ЛТ), ХТ и химиолучевой (ХЛТ) терапии.

Только ЛТ (1970–1978 гг.) получили 77 женщин: облучение в суммарной очаговой дозе (СОД) 40 Гр лимфатических областей выше диафрагмы и селезенки (при отсутствии спленэктомии; селезенка удалена у 18 (24,3 %) пациенток). Кроме этого, у 15 больных в СОД 20–40 Гр облучены лимфатические области ниже диафрагмы: у 9 пациенток – парааортальная, у 5 – пахово-подвздошные с одной (3 человека) или с двух (2 человека) сторон; экстранодальные очаги (кости таза) – у 2 человек. ЛТ была дополнена введением винбластина по 10 мг 1 раз в 10–14 дней в течение 6–24 мес у 24 (32,4 %) пациенток.

Таблица 1. Распределение женщин в зависимости от проведенной терапии и стадии ЛХ

Программа лечения	Число женщин							Итого
	Стадии ЛХ							
	IA	IIA	IIIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB	
ЛТ 40 Гр ± Vb	4	36	20	5	9	3	—	77
ХТ COPP + ЛТ 40 Гр	19	106	39	10	12	21	17	224
ХТ ABVD + ЛТ 20–30 Гр	—	10	2	5	—	—	1	18
ХТ BEACOPP + ЛТ 20–30 Гр	—	—	—	1	—	2	4	7
ХТ COPP, CEP, COPP/ABV, CHOP + ЛТ 20–30 Гр	—	3	2	2	—	1	—	8
ХТ COPP, BEACOPP	—	—	—	—	—	2	4	6
Всего	23	155	63	23	21	29	26	340

Примечание. Vb – винбластин; COPP – циклофосфан, винкристин, натулан, преднизолон; ABVD – доксорубицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин; BEACOPP – блеомицин, вепезид, доксорубицин, циклофосфан, винкристин, натулан, преднизолон; CEP – белустин, вепезид, преднизолон; COPP/ABV – циклофосфан, винкристин, натулан, преднизолон, доксорубицин, блеомицин, винбластин; CHOP – циклофосфан, доксорубицин, винкристин, преднизолон.

Комбинированное химиолучевое лечение получили 253 пациентки. Из них 224 проводилась (1978–1998 гг.) ХТ по схемам COPP/CVPP (от 1 до 12 циклов, медиана – 4 цикла) с последующим облучением лимфатических областей выше диафрагмы и селезенки (спленэктомия – 4 (1,8 %) человека) в СОД 40 Гр, дополненным облучением в СОД 20–40 Гр парааортальной области (12 человек), пахово-подвздошной с одной стороны (1 человек), экстранодальных очагов (тотальное облучение одного легкого – 10 человек, костей таза – 1 человек). Двадцати девяти женщинам ХТ проводилась по схемам ABVD, BEACOPP, COPP/ABV, COPP, CHOP, CEP с последующим облучением очагов поражения лимфатических областей и отдельных смежных лимфатических зон выше диафрагмы в уменьшенных СОД – 20–30 Гр (1999–2011 гг.). Кроме того, у 5 пациенток облучены парааортальная область, у 2 – экстранодальные очаги (одно легкое тотально – 1 человек, оба легких тотально – 1 человек).

Шесть женщин получили только ХТ по схемам COPP (5 человек), BEACOPP (1 человек).

ЛТ проводилась на гамма-терапевтических установках в традиционном режиме фракционирования дозы облучения, 5 раз в неделю, через противоположные поля.

Разовая очаговая доза при облучении лимфатических областей, костей – 1,8–2,0 Гр, при облучении легкого – 1,0 Гр. СОД в лимфатических областях составляла 20–40 Гр, в костях – 40 Гр, в одном легком – 18 Гр, обоих легких – 14–16 Гр.

В первой ремиссии ЛХ находилось 328 женщин, 12 имели до беременности рецидив ЛХ и получали различные варианты противорецидивного лечения.

Сбор информации о состоянии здоровья родившихся детей проводился путем опроса матерей с помощью анкет, с использованием выписок из первич-

ной медицинской документации по месту жительства. В вопросах были отражены сроки родов после лечения ЛХ, возраст женщин ко времени родов, рост, масса тела, врожденная и наследственная патология у детей, наличие ЛХ.

Результаты

Большинство женщин – 188 (55,4 %) человек – имели первую, после лечения ЛХ, беременность в промежутке от 1 до 3 лет; 73 (21,4 %) человека – через 4–5 лет, 79 (23,2 %) человек – через 6–17 лет. Возраст женщин ко времени первых родов составил от 18 до 38 лет (медиана – 24 года).

Беременность завершилась родами у 338 женщин. Одни роды были у 276 (81,6 %), двое – у 57 (16,9 %), трое – у 4 (1,2 %), четверо – у 1 (0,3 %) женщины. У 5 (1,2 %) женщин родились двойни. Общее количество родов – 406. Самостоятельных родов было 380 (93,6 %), родоразрешение оперативным путем выполнено у 26 (6,4 %) женщин.

У 2 женщин беременность прервана: у первой – на 22-й неделе из-за патологии плода (синдром Денди-Уокера), у 2-й – на 11-й неделе из-за внутриутробной гибели плода вследствие патологии мочеполовой системы (синдром Prune Belly).

Родилось 411 детей. Трое родились в 2 семьях, в которых лечение ЛХ получили оба родителя. Мальчиков было 195 (47 %), девочек – 216 (53 %). Двое были мертворожденными (1 вследствие травмы матери). В течение первых нескольких часов или дней после рождения умерло 5 детей. Причинами смерти явились: отек головного мозга (1 человек), легочно-сердечная недостаточность (2 человека, в 1 случае у женщины с преждевременными родами), не связанная с родами травма (1 человек), нежизнеспособность плода (1 человек, микроцефалия, на 8-м месяце беременности).

Доношенными были 387 (94 %) детей.

Число родившихся детей в зависимости от программы лечения ЛХ их матерей представлено в табл. 2.

Таблица 2. Число детей, родившихся у женщин после различных программ лечения ЛХ

Программа лечения	Число		
	женщины	дети	двойни
ЛТ 40 Гр	77	95	3
ХЛТ: ХТ СОРР + ЛТ 40 Гр	224	275	1
ХЛТ: ХТ АВВД, ВЕАСОРР, СОРР/АВВ и др. + ЛТ 30–20 Гр	31	35	1
ХТ СОРР, ВЕАСОРР	6	6	0
<i>Всего</i>	<i>338</i>	<i>411</i>	<i>5</i>

Масса тела родившихся детей составила от 2200 до 4600 г (медиана – 3400), рост – от 46 до 58 см (медиана – 52). Масса тела детей-близнецов – от 1500 до 1700 г, рост – от 42 до 45 см.

Физические характеристики детей в зависимости от программы лечения ЛХ их матерей представлены в табл. 3.

При рождении у 10 детей выявлена следующая патология: микроцефалия – 2 человека, гидроцефалия – 1 человек, порок сердца – 3 человека, расщелина верхней губы – 1 человек, множественные экзостозы костей – 1 человек, фимоз – 1 человек, гипотрофия мышц руки – 1 человек.

Помимо данных, полученных о детях при рождении, нами собраны сведения о состоянии их здоровья в процессе жизни. Период наблюдения составил до 40 лет (медиана – 12 лет) (табл. 4).

В процессе жизни у 15 человек выявлены относительно редко встречающиеся патологии: гипотиреоз – 1 человек, дисплазия тазобедренного сустава – 1 человек, мезенхимома плечевой кости – 1 человек, ЛХ – 3 че-

ловека, тромбоцитопатия – 1 человек, фиброзная дисплазия кости – 1 человек, сенсорная тугоухость – 2 человека в одной семье; тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (заболевание, сцепленное с X-хромосомой) – 2 человека в одной семье, агенезия почки – 1 человек, удвоение почки – 1 человек, эндометриоз – 1 человек.

Таблица 4. Длительность наблюдения за детьми, родившимися у женщин после лечения ЛХ

Продолжительность наблюдения (лет)	Число детей
0 ¹	411
от 0 до 5	334
от 0 до 10	225
от 0 до 15	129
от 0 до 20	95
от 0 до 30	63
от 0 до 40	16

¹Наблюдались при рождении.

При ретроспективной оценке полученных данных к врожденным заболеваниям отнесены: микроцефалия – 2, гидроцефалия – 1, порок сердца – 3, расщелина верхней губы – 1, множественные экзостозы костей – 1, агенезия почки – 1, удвоение почки – 1, гипотрофия мышц руки – 1, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность – 2, дисплазия тазобедренного сустава – 1, сенсорная тугоухость – 2, фимоз – 1. С учетом 2 случаев прерывания беременности общее количество врожденных патологий составило 19 (4,6 %) случаев из 411 наблюдений.

Зарегистрированы следующие наследственные заболевания: расщелина верхней губы – 1 человек, экзостозная хондродисплазия – 1 человек, множественные экзостозы кости – 1 человек, гипотрофия мышц ру-

Таблица 3. Масса тела и рост новорожденных детей¹ в зависимости от различных программ лечения матерей

Программа лечения матерей	Пол детей	Число детей	Масса, кг (медиана)	Рост, см (медиана)
ЛТ 40 Гр	женский	47	2,5–3,9 (3,0)	48–54 (50)
	мужской	42	2,4–4,3 (3,5)	47–57 (53)
ХТ СОРР + ЛТ 40 Гр	женский	145	2,8–4,4 (3,5)	46–55 (52)
	мужской	128	2,2–4,6 (3,6)	48–58 (53)
ХТ АВВД, ВЕАСОРР, СОРР/АВВ и др. + ЛТ 30–20 Гр	женский	15	3,0–4,2 (3,3)	49–56 (52)
	мужской	13	2,2–4,6 (3,6)	47–54 (53)
ХТ СОРР, ВЕАСОРР	женский	4	2,8–3,4 (3,2)	46–52 (50)
	мужской	2	3,0; 3,1	50; 48

¹Кроме двоен.

ки – 1 человек, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность – 2 человека (мальчики) в одной семье, сенсорная тугоухость – 2 человека (девочки) в одной семье, наследственная тромбоцитопатия – 1 человек. Множественные экзостозы костей и тромбоцитопатия были в анамнезе у отцов.

Сведения о врожденной и/или наследственной патологии приведены в табл. 5.

Как следует из представленных данных, женщины, у детей которых выявлена врожденная и/или наследственная патология, ко времени родов были в возрасте до 35 лет. Период времени между лечением ЛХ и родами составил от 1 до 13 лет (медиана – 5 лет). Программы лечения матерей были различными.

В соответствии с анкетными данными, полученными в процессе жизни, установлено, что физическое состояние, психический статус, частота и характер перенесенных заболеваний детей, не имевших врожденной и/или наследственной патологии, не имели каких-либо особенностей.

Большинство детей посещало обычные дошкольные учреждения. Школьное образование получили все дети соответствующего возраста. Существенного отставания в физическом и психическом развитии не отмечено, исключение составляют 2 детей с замедленным развитием речи (устойчивая речь сформировалась к 3- и 5-летнему возрасту соответственно).

В течение времени наблюдения умерло 5 человек: вследствие пневмоцистной пневмонии (осложнение тяжелой комбинированной иммунной недостаточности) в возрасте 5 месяцев – 1; от сепсиса (ребенок с микроцефалией) в возрасте 1,5 лет – 1; от цирроза печени в возрасте 29 лет – 1; вследствие суицидальных действий в возрасте 27 лет и 31 года – 2 человека.

Второе поколение составило 23 человека, одна пара из которых – двойня (девочка и мальчик). Период получения сведений о состоянии здоровья этих детей – от 1 мес до 12 лет. Врожденная патология – крипторхизм – выявлена у 1 (4,3 %) человека. У 1 ребенка развилась эпилепсия.

Таблица 5. Врожденная и/или наследственная патология у детей и плодов

Патология	Возраст матери к родам (лет)	Срок родов после лечения ЛХ (лет)	Программа лечения ЛХ ¹
Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность	22 28	3 9	ABVD (5) + ЛТ очагов
Патология мочеполовой системы	30	3	BEACOPP (6)
Синдром Денди–Уокера	26	5	COPP/ABV (5) + ЛТ очагов
Расщелина верхней губы	32	7	COPP (6) + ЛТ-РП + п/а
Агенезия почки	23	5	COPP (4) + ЛТ-РП
Удвоение почки	25	6	COPP (6) + ЛТ-РП
Наследственная тромбоцитопатия	23	5	COPP (1) + ЛТ-РП
Дисплазия тазобедренного сустава	22	5	COPP (1) + ЛТ-РП
Врожденный порок сердца	27	4	COPP (6) + ЛТ-РП + п/а
Врожденный порок сердца	22	4	ЛТ-РП + Vb
Врожденный порок сердца	23	6	COPP (6) + ЛТ-РП
Полиоссальная форма фиброзной дисплазии кости	29	5	COPP (5) + ЛТ очагов
Множественные экзостозы кости	24	4	COPP (3) + ЛТ-РП
Фимоз	34	13	ЛТ-РП + Vb
Гидроцефалия	24	1	COPP (3) + ЛТ-РП
Микроцефалия	25	1	COPP (3) + ЛТ-РП
Микроцефалия	24	1	Различные варианты ХЛТ
Сенсорная тугоухость	16 26	1 10	ЛТ-РП
Гипотрофия мышц руки	18	2	COPP (1) + ЛТ-РП

Примечание. ¹ – (n) – количество циклов ХТ по соответствующим схемам; РП – радикальная программа ЛТ, облучение лимфатических областей выше диафрагмы ± селезенка в СОД 40 Гр; п/а – парааортальная область; Vb – винбластин.

Обсуждение

Возможное влияние ЛХ и химиолучевого лечения на состояние потомства представляет важную проблему с тех самых пор, как стало возможным излечение от этого заболевания.

Несмотря на то, что по мере увеличения баз данных исследователей росло и число детей, у которых оценивалось состояние здоровья, число соответствующих публикаций в силу определенных методологических трудностей все еще относительно невелико.

В одной из первых публикаций, работе Г.Д. Байсоголова и соавт. [5], описано состояние здоровья 36 детей непосредственно после родов у 33 женщин, получивших ЛТ в объеме воздействия на лимфатические коллекторы выше диафрагмы и селезенку, с подведением СОД облучения 40 Гр. Авторы пришли к заключению, что здоровье детей не имело каких-либо особенностей. Такой же вывод последовал в результате работы В.Л. Madsen et al. [6], исследовавших состояние здоровья 36 новорожденных у 18 женщин после ЛТ на лимфатические коллекторы выше диафрагмы и парааортальную зону с подведением СОД 40 Гр по поводу ЛХ. По данным И.В. Пыловой [7], беременности 58 пациенток после комбинированной терапии ЛХ завершились рождением 57 детей, не имевших врожденной патологии, и в 1 случае — с анэнцефалией. Этот ребенок был представителем единственной двойни.

А.Ж. Swerdlow et al. [8] проанализировали сведения о состоянии здоровья 49 детей, родившихся от 11 мужчин и у 16 женщин, получивших ЛТ и ХЛТ по поводу ЛХ в госпитале Mount Vernon (London) в период с 1970 по 1991 г. Учитывая, что около половины этих пациентов получили ХТ, авторы сочли необходимым оценить потенциально мутагенный эффект цитостатиков, исследовав хромосомный статус детей. Частота каких-либо отклонений от нормального уровня здоровья и аномалий хромосом детей не превышала таковую в обычной популяции, однако из-за малого числа детей исследователи воздержались от определенных выводов. Эти авторы обратили также внимание на более высокую по сравнению с популяционной частоту рождения близнецов, отнеся это к повышению активности питуитарного гонадотропина.

Сведения о большей частоте многоплодной беременности у больных ЛХ представлены Р.Г. Шмаковым [2] (7 (7,3 %) из 96 беременностей), причем частота рождения близнецов была обратно пропорциональной периоду времени между окончанием химиолучевого лечения ЛХ и зачатием ребенка. Оценивая другие аспекты проблемы, автор установил, что физическое развитие детей, частота врожденной и приобретенной патологии новорожденных у матерей с ЛХ не отличались от таковых в обычной популяции. К такому же выводу пришла Т.Д. Комова [9].

Частота рождения близнецов — 5 (1,2 %) на 408 беременностей — в нашем исследовании, в отличие от других авторов [2, 8], оказалась идентичной популяцион-

ной. Такое различие может быть связано с большим размером исследованной нами группы пациентов.

Нами оценено состояние здоровья наибольшего из опубликованных к настоящему времени контингента детей, родившихся у женщин, получивших лечение ЛХ.

Непосредственное влияние цитостатиков на плод хорошо изучено на животных моделях. У животных подобные повреждения ДНК вследствие воздействия цитостатиков в гонадотоксичных дозах коррелировали с повышением вероятности развития патологии беременности и рождения детенышей с аномалиями развития [10].

Повышенная восприимчивость плода к тератогенным воздействиям в I триместре беременности является, по единодушному мнению исследователей, основанием для исключения применения ХТ.

В нашей работе возможность непосредственного влияния цитостатиков на плод исключена, так как ХТ во время беременности не проводилась ни одной из включенных в исследование женщин.

Непосредственный интерес относительно возможного влияния лечения больных ЛХ женщин на их потомство представляют врожденные и наследственные пороки развития, встречающиеся у детей, родившихся после лечения их матерей.

Возможность формирования у плода врожденной патологии связана с тем, что у больных матерей с сохранившейся после лечения ЛХ функцией яичников репарационные процессы в ооцитах позволяют клеткам с приобретенными мутациями остаться в живых [10].

Врожденные пороки развития — группа патологических состояний, включающая аномалии органов и систем различной этиологии: генетической, воздействия факторов окружающей среды и многофакторной. Этиология большинства врожденных пороков развития — мультифакторная.

Врожденные пороки представляют серьезную проблему, занимая 8 % в структуре причин смертности новорожденных в течение первых 28 дней жизни [11].

Причины около половины врожденных нарушений развития неизвестны, а риск их повторения у потомства минимален. Исключительно генетическая причина обуславливает развитие около 20 % пороков развития. Приблизительно для 20 % аномалий характерно сочетание некритических генетических дефектов и факторов риска окружающей среды. Непосредственно с воздействием окружающей среды связано только около 10 % аномалий развития [12, 13].

Частота врожденных пороков, как правило, не превышает 20 случаев на 1000 живорожденных детей. Так, по данным К.О. Лазаревой [14], эта частота среди детей Ростовской области составила 15,3 на 1000 живорожденных. Суммарная частота врожденных пороков среди новорожденных и плодов в Краснодарском крае оказалась приблизительно такой же — 19,8 на 1000 [15].

В нашем исследовании частота врожденных пороков составила 19 на 411 (при пересчете на 1000 ново-

рожденных и плодов – 45,4). Сопоставление полученных нами данных с частотой врожденных пороков в общей популяции проблематично, так как число детей, родившихся у женщин после лечения ЛХ, недостаточно велико для проведения этой оценки. Кроме того, ряд пороков развития встречается довольно редко. Так, частота синдрома Денди–Уокера составляет 1:25 000–30 000 [16], нейросенсорной тугоухости – 1:100 000–200 000 [17], врожденной расщелины верхней губы и/или неба – 1:1000 [17], микроцефалии – 2:10 000 [18], гидроцефалии – 0,2–4:1000 [18], односторонней агенезии почки – 1:1000 [17], тяжелой комбинированной иммунной недостаточности – 1:250 000 [19], синдрома Prune Belly – 1:45 000 [20]. Чаще встречаются: удвоение почки – 1:130 [17], врожденные пороки сердца – 1:100 [21].

Исходя из того, что мы рассматриваем проблему качества потомства женщин, получивших лечение по поводу ЛХ, определенный интерес представляет частота заболевания ЛХ у их детей.

К настоящему времени считается, что ЛХ не является четко генетически обусловленным и наследуемым опухолевым заболеванием. Вместе с тем генетическая предрасположенность к ЛХ подтверждается как случаями «семейной» заболеваемости, так и открытием все возрастающего количества специфических генов. Описано возникновение ЛХ в I, II и III поколениях [22], в которых повышена также частота других гематологических и солидных опухолей [23]. Гаплотипы лейкоцитарного антигена человека у больных ЛХ, другими гематологическими, солидными опухолями могут совпадать, передаваться потомству [24]. Риск возникновения ЛХ у обоих однояйцевых близнецов в 100 раз превышает таковой у разнояйцевых, указывая на то, что наличие одинакового определенного генотипа имеет гораздо большее значение для развития ЛХ, чем общие условия внешней среды [25]. В когортных исследованиях устойчиво отмечается наличие 3–7-кратного риска возникновения ЛХ среди I поколения детей больных ЛХ, а также случаи других гематологических «семейных» опухолей [26, 27]. Изучение данных популяционных и семейных регистров, наименее подверженных системным отклонениям, дает аналогичные результаты [28]. Показано, что риск возникновения ЛХ среди братьев и сестер, родившихся от больного ЛХ, выше, чем был у их родителей, а ЛХ регистрируется в более раннем возрасте [29]. Кроме того, у них чаще выявляются другие лимфомы, особенно крупноклеточная диффузная лимфома, а также солидные опухоли, аутоиммунные заболевания (рассеянный склероз и др.) [30, 31]. В качестве возможной генетической подоплеки возникновения ЛХ рассматривается район

генов комплекса гистосовместимости в 6-й хромосоме и целый ряд генов, кодирующих различные цитокины. Кроме того, в одном из исследований, проведенном у членов 44 семей с повышенным риском возникновения ЛХ, показана связь ЛХ с рецессивным наследованием с участием хромосом 2, 4p, 4q, 7, 11 и 17 [32].

В нашем исследовании ЛХ развилась у 3 человек I поколения в возрасте 21, 23, 25 лет, родившихся от матерей, получивших химиолучевое лечение ЛХ.

Кроме того, мы располагаем собственными данными о случаях «семейной» ЛХ, полученными в течение периода с 1970 по 2011 г. среди 4000 первичных больных ЛХ. Сведения о количестве семей, в которых ЛХ диагностирована более чем у 1 члена семьи, степени их родства представлены в табл. 6.

Обращает на себя внимание находящаяся под нашим наблюдением 1 семья, в которой ЛХ болела мать, ее сын, дочь сына. Следует отметить, что заболевание ЛХ детей выявлено до лечения ЛХ родителей.

Таблица 6. «Семейная» ЛХ

Категории семей	Степень родства	Количество семей
Развитие у ребенка ЛХ до лечения ЛХ родителя	Отец – сын	2
	Отец – дочь	2
	Бабушка – внучка	1
	Мать – сын	4
	Мать – дочь	6
	Мать – сын – дочь сына	2
Развитие у ребенка ЛХ после лечения родителя	Мать – дочь	3
Развитие ЛХ у ребенка, родители которого не болели ЛХ	Братья, 2 человека	1
	Братья и сестры, 6 человек	3
<i>Всего семей</i>		<i>24</i>

Заключение

Таким образом, к настоящему времени может быть сделано заключение, что у женщин, получивших лечение ЛХ, здоровыми рождается большинство детей. Вместе с тем требуется дальнейшее накопление данных о состоянии здоровья детей с учетом различных вариантов лечения их матерей – схем ХТ, объемов облучения. Учитывая литературные и собственные данные, следует принимать во внимание повышенный риск развития ЛХ у детей, родившихся как до установления диагноза ЛХ у одного из родителей, так и после лечения ЛХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шахтарина С.В. Лучевое, полихимио-лучевое, лекарственное лечение первичных форм лимфогранулематоза I–IV стадий. Дис. ... д-ра мед. наук. Обнинск, 1995.
2. Шмаков Р.Г. Репродуктивное здоровье женщин с онкогематологическими заболеваниями. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2008.
3. Balcewicz-Sablinska K., Ciesluk S., Kopee I. et al. Analysis of pregnancy, labor, child development and disease course in women with Hodgkin's disease. *Acta Haematol Pol* 1990;21(1):72–80.
4. Janov A.J., Anderson J., Cella D.F. et al. Pregnancy outcome in survivors of advanced Hodgkin's disease. *Cancer* 1992;70(3):688–92.
5. Байсоголов Г.Д., Шишкин И.П., Щелконогова Л.Н. Течение беременности и состояние родившихся детей у больных, леченных по поводу лимфогранулематоза. *Мед радиол* 1985;5:35–7.
6. Madsen B.L., Guidice L., Donaldson S.S. Radiation-induced premature menopause: a misconception. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32(5):1461–4.
7. Пылова И.В. Репродуктивная функция у женщин, больных лимфомой Ходжкина. Влияние беременности и родов на течение заболевания. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2007.
8. Swerdlow A.J., Jacobs P.A., Marks A. et al. Fertility, reproductive outcomes, and health of offspring of patients treated for Hodgkin's disease: an investigation including chromosome examinations. *Br J Cancer* 1996;74(2):291–6.
9. Комова Т.Д. Особенности течения беременности, родов и послеродового периода у женщин с лимфомой Ходжкина в ремиссии. Дис. ... канд. мед. наук. Иваново, 2009.
10. Arnon J., Meirou D., Lewis-Roness H. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reprod Update* 2001;7:394–403.
11. ВОЗ, информационный бюллетень № 370, октябрь 2012 г.
12. Бочков Н.П., Рослова Т.А., Якушина И.И. Медико-генетическое консультирование по поводу мутагенных и тератогенных воздействий. *Мед генетика* 2009;79:3–8.
13. Ромеро Р., Пилу Д., Дженти Ф. Пренатальная диагностика врожденных пороков развития плода: пер. с англ. М.: Медицина, 1994.
14. Лазарева К.О. Частота и структура врожденных пороков развития у новорожденных Ростовской области и факторы их формирования. Дис. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2007.
15. Панкова Е.Е. Эпидемиология врожденных пороков развития в Краснодарском крае. Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2009.
16. Osenbach R.K., Menezes A.H. Diagnosis and management of the Dandy-Walker malformation: 30 years of experience. *Pediatr Neurosurg* 1992;18(4):179–89.
17. Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова Е.В., Блинникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. М.: Практика, 1996. 416 с.
18. Бернадский Ю.И. Травматология и восстановительная хирургия черепно-лицевой области. М., 1999.
19. Moise A., Nedelcu F.D., Toader M.A. et al. Primary immunodeficiencies of the B lymphocyte. *J Med Life* 2010;3(1):60–3.
20. Tonni G., Ida V., Alessandro V., Bonasoni M.P. Prune-belly syndrome: case series and review of the literature regarding early prenatal diagnosis, epidemiology, genetic factors, treatment, and prognosis. *Fetal Pediatr Pathol* 2013;31(1):13–24.
21. Hoffman J. *Essential Cardiology: Principles and Practice*. Totowa NJ: Humana Press, 2005.
22. Lin A.Y., Kingma D.W., Lennette E.T. et al. Epstein-Barr virus and familial Hodgkin's disease. *Blood* 1996;88(8):3160–5.
23. Goldin L.R., Pfeiffer R.M., Gridley G. et al. Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer* 2004;100:1902–8.
24. Chakravarti A., Halloran S.L., Bale S.J. et al. Etiological heterogeneity in Hodgkin's disease: HLA linked and unlinked determinants of susceptibility independent of histological concordance. *Genet Epidemiol* 1986;3(6):407–15.
25. Mack T.M., Cozen W., Shibata D.K. et al. Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med* 1995;332:413–8.
26. Brown J.R., Neuberger D., Phillips K. et al. Prevalence of familial malignancy in a prospectively screened cohort of patients with lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 2008;143(3):361–8.
27. Hemminki K., Czene K. Attributable risks of familial cancer from the Family-Cancer Database. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002;11:1638–44.
28. Casey R., Brennan P., Becker N. et al. Influence of familial cancer history on lymphoid neoplasms risk validated in the large European case-control study epilymph. *Eur J Cancer* 2006;42(15):2570–6.
29. Altieri A., Hemminki K. The familial risk of Hodgkin's lymphoma ranks among the highest in the Swedish Family-Cancer Database. *Leukemia* 2006;20(11):2062–3.
30. Goldin L.R., Bjorkholm M., Kristinsson S.Y. et al. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *Br J Haematol* 2009;146(1):91–4.
31. Landgren O., Kerstann K.F., Gridley G. et al. Familial clustering of Hodgkin lymphoma and multiple sclerosis. *J Natl Cancer Ins* 2005;97(7):543–4.
32. Goldin L.R., McMaster M.L., Ter-Minassian M. et al. A genome screen of families at high risk for Hodgkin lymphoma: evidence for a susceptibility gene on chromosome 4. *J Med Genet* 2005;42:595–601.

Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования

Н.Н. Климко¹, О.В. Шадринова¹, С.Н. Хостелиди¹, Е.А. Десятник¹, Ю.В. Борзова¹,
Р.М. Чернопятова¹, Е.В. Шагдилеева¹, А.Г. Волкова², М.О. Попова², И.С. Зюзгин³,
О.С. Ружинская³, О.Е. Рябыкина³, Н.В. Медведева⁴, А.С. Колбин⁵, Э.Г. Бойченко⁵,
Т.С. Богомолова¹, С.М. Игнатьева¹, Л.С. Зубаровская², Б.В. Афанасьев²

¹Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

³ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница»;

⁴СПб ГУЗ «Городская больница №31», Санкт-Петербург;

⁵Детская городская больница №1, Санкт-Петербург

Контакты: Николай Николаевич Климко n_klimko@mail.ru

Представлены результаты многоцентрового исследования, в которое включили 445 пациентов с «доказанным» и «вероятным» инвазивным аспергиллезом (EORTC/MSG, 2008). Установлено, что инвазивный аспергиллез возникает преимущественно у онкогематологических больных (88%), основными фоновыми заболеваниями являются острый миелоидный и острый лимфобластный лейкоз. Предрасполагающими факторами служат длительный агранулоцитоз (64%), цитостатическая полихимиотерапия (57%), лимфоцитопения (46%), применение системных глюкокортикостероидов (45%), а также аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (29%). Наиболее частые возбудители — *A. fumigatus* (42%), *A. niger* (33%) и *A. flavus* (21%). Основная клиническая форма — поражение легких (86%). Общая выживаемость в течение 12 нед составила 83%. Ранняя диагностика (проведение фибробронхоскопии; $p = 0,01$) и адекватная терапия (применение вориконазола; $p = 0,002$), а также вторичная антимикотическая профилактика ($p = 0,0003$) достоверно улучшают показатели выживаемости больных инвазивным аспергиллезом.

Ключевые слова: *Aspergillus*, инвазивный аспергиллез, гемобластозы, вориконазол

Invasive aspergillosis: results of multicenter study

N.N. Klimko¹, O.V. Shadrivova¹, S.N. Khostelidi¹, E.A. Desyatnik¹, Yu.V. Borzova¹, R.M. Chernopyatova¹,
E.V. Shagdilееva¹, A.G. Volkova², M.O. Popova², I.S. Zyzgin³, O.S. Ruzhinskaya³, O.Ye. Ryabykina³, N.V. Medvedeva⁴, A.S. Kolbin⁵,
E.G. Boychenko⁵, T.S. Bogomolova¹, S.M. Ignatieva¹, L.S. Zubarovskaya², B.V. Afanasiev²

¹P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg;

²Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation,

I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia;

³Leningrad Regional Hospital, Saint Petersburg;

⁴Municipal Hospital №31, Saint Petersburg;

⁵Children Municipal Hospital №1, Saint Petersburg

We present the results of a multicenter study of 445 patients with “proven” and “probable” invasive aspergillosis (EORTC/MSG, 2008). Invasive aspergillosis usually occurs in patients with hematological malignancies (88%), main underlying diseases were acute myeloid and acute lymphoblastic leukemia. The risk factors: prolonged agranulocytosis (64%), cytostatic chemotherapy (57%), corticosteroid treatment (45%), and allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (29%). The pathogens — *A. fumigatus* (42%), *A. niger* (33%), and *A. flavus* (21%). The main site of infection were lungs (86%). 12 week overall survival was 83%. Bronchoscopy use for the early diagnosis ($p = 0.01$), adequate therapy with voriconazole ($p = 0.002$) and secondary antifungal prophylaxis ($p = 0.0003$) were positive prognostic factors for survival of patients with invasive aspergillosis.

Key words: *Aspergillus*, invasive aspergillosis, hematological malignancies, voriconazole

Введение

Инвазивные микозы, в том числе заболевания, вызванные грибами рода *Aspergillus* spp., в настоящее время остаются актуальной клинической проблемой. Развитие новых высокоэффективных медицинских технологий, включая трансплантацию гемопоэтических

стволовых клеток (ТГСК), применение высокодозной цитостатической химиотерапии, таргетной терапии (моноклональных антител) и новых поколений иммуносупрессивных препаратов, таких как ингибиторы фактора некроза опухоли альфа, а также совершенствование методов диагностики привели к увеличению

количества иммунокомпрометированных пациентов с высоким риском развития инвазивных микозов [1]. Инвазивный аспергиллез (ИА) отличается тяжелым течением и высокой летальностью, развитие этого осложнения приводит к нарушению лечения фонового заболевания и существенно увеличивает стоимость терапии.

Цель нашего исследования — изучение распространенности, факторов риска развития ИА, этиологии, клинических признаков, а также анализ эффективности применяемых методов диагностики и лечения ИА.

Материалы и методы

Нами создан регистр больных, в который включены 445 пациентов с «доказанным» и «вероятным» ИА, госпитализированных в период с 1998 по 2013 г. в различные отделения 19 многопрофильных стационаров г. Санкт-Петербурга. Мы проанализировали факторы риска, этиологию, основные клинические признаки, применяемые методы диагностики и лечения ИА. Проводили проспективное исследование с ретроспективным анализом. Для диагностики ИА и оценки эффективности антифунгальной терапии использовали критерии EORTC/MSG 2008 г. [1].

Инструментальные методы диагностики: всем пациентам проводили компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения, а также по показаниям — КТ придаточных пазух носа (ППН), органов брюшной полости и забрюшинного пространства, магнитную резонансную томографию головного мозга, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, пункцию околоносовых придаточных пазух, плевральную и люмбальную пункции, а также биопсию тканей. Выполняли фибробронхоскопию с проведением бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ).

Лабораторная диагностика ИА включала микроскопическое и культуральное исследование. Из образцов биосубстратов (мокрота, БАЛ) готовили препараты в просветляющей жидкости (10 % раствор КОН в 10 % водном растворе глицерина) с добавлением флуоресцирующего маркера (калькофлуор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе, отмечали наличие септированных нитей мицелия, ветвящихся под углом 45°. Для определения культуры гриба выполняли посев патологического материала на специализированную среду и инкубировали в течение 10 дней при +28 и +37 °С. Из операционного и биопсийного материала готовили гистологические препараты, окрашивая срезы гематоксилином и эозином, проводили PAS-реакцию и окраску по методу Гомори—Грокотта для выявления элементов гриба.

Серологическое исследование включало определение галактоманнана в сыворотке крови, спинномозговой жидкости (СМЖ) и БАЛ двойным иммуноферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы Platelia® *Aspergillus* (Bio-Rad Laboratories, США). Наличие галактоманна оценивали путем сравнения оптической плотности

исследуемого материала и контрольного образца, содержащего 1нг/мл галактоманнана. Диагностически значимым считали индекс выше 0,5 в сыворотке крови, СМЖ и выше 1,0 — в БАЛ.

Полученные в процессе исследования медико-биологические данные обрабатывали с помощью программной системы Statistica 6.0. Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Уилкоксона—Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В исследование включили 445 пациентов с вероятным и доказанным ИА в соответствии с критериями EORTC/MSG 2008 г., в возрасте от 1 до 83 лет (медиана — 36 лет). Среди них 80 % взрослых ($n = 356$, медиана возраста — 45 лет) и 20 % детей до 18 лет ($n = 89$, медиана возраста — 11 лет); мужчин — 55 %, женщин — 45 %. При анализе фоновых заболеваний выявлено, что ИА развивается преимущественно у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, которые, по данным нашего регистра, составляют 88 % ($n = 393$). Наиболее часто фоновыми заболеваниями были острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), реже лимфомы, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз и множественная миелома, в единичных случаях — миелодиспластический синдром, апластическая анемия и прочие гемобластозы. Другими фоновыми состояниями, предшествующими развитию ИА, были: хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — 3 %, злокачественные новообразования — 2 %, хронический синусит, медикаментозный агранулоцитоз, хроническая почечная недостаточность, заболевания соединительной ткани, туберкулез и иммунодефициты (табл. 1).

Исследование факторов риска показало, что у пациентов с гемобластозами ИА чаще всего развивается на фоне проведения полихимиотерапии (ПХТ) — 57 % ($n = 252$). Реципиенты трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток составили 29 % ($n = 130$) от всех исследуемых. ИА развился в течение 3—500 дней после аллогенной ТГСК (алло-ТГСК) (медиана — 44 дня); у 71 % реципиентов трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток микоз возник в раннем посттрансплантационном периоде (до 100-го дня); острая или хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) была зафиксирована у 82 % реципиентов.

В период, предшествующий развитию ИА, длительный (≥ 10 сут) агранулоцитоз выявили у 64 % пациентов ($n = 286$, медиана — 15 дней), лимфоцитопению зафиксировали у 46 % ($n = 206$, медиана — 14 дней). Применение системных глюкокортикостероидов, в том числе в составе курсов цитостатической или иммуносупрессивной терапии, отмечено в 45 % случаев ($n = 201$), хирургические вмешательства — в 9 %, трансплантация органов — в 1 % (табл. 2).

Таблица 1. Структура фоновых заболеваний у больных ИА

Нозологическая форма	Число больных, n = 445	
	%	абс.
Гематологические заболевания (n = 393)		
ОМЛ	29	128
ОЛЛ	22	98
Неходжкинская лимфома	10	46
Лимфома Ходжкина	7	31
Хронический миелоидный лейкоз	4	20
Хронический лимфоцитарный лейкоз	4	17
Миелодиспластический синдром	4	18
Множественная миелома	4	18
Апластическая анемия	2	8
Другие гемобластозы	2	9
Прочие заболевания (n = 52)		
ХОБЛ	3	13
Злокачественные новообразования	2	9
Хронический синусит	1,5	7
Медикаментозный агранулоцитоз	1,5	6
Хроническая почечная недостаточность	1	4
Заболевания соединительной ткани	1	4
Туберкулез	0,5	3
Первичный иммунодефицит и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)	0,5	2
Другие	1	4

Таблица 2. Факторы риска и фоновые состояния пациентов с ИА

Факторы риска и фоновые состояния	Число больных (n = 445)	
	абс.	%
Агранулоцитоз	286	64
Длительность агранулоцитоза, дни	Медиана – 15	
Лимфоцитопения	206	46
Длительность лимфоцитопении, дни	Медиана – 14	
Глюкокортикостероиды	201	45
Алло-ТГСК	130	29
РТПХ	107	24
ПХТ	252	57
Число курсов ПХТ	Медиана – 10	

Сопутствующую или недавно перенесенную лабораторно подтвержденную бактериальную инфекцию

выявили у 23 % пациентов с ИА, наиболее часто – бактериальный сепсис. Вирусную инфекцию перенесли 16 % пациентов, преимущественно цитомегаловирусную – 9 %.

Основной локализацией патологического процесса были легкие (изолированное поражение или в сочетании с другими локализациями) – 86 %, ППН – 8 % и центральная нервная система (ЦНС) – 5 %. Поражение 2 и более органов было выявлено у 8 % больных. Клинические варианты ИА отличались у гематологических больных и с другими фоновыми заболеваниями. В 1-й группе достоверно чаще выявляли поражение легких, во 2-й – ППН (табл. 3).

Таблица 3. Локализация ИА у различных групп пациентов

Очаги локализации ИА	Гематологические пациенты, n = 393		Негематологические пациенты, n = 52		p – уровень значимости различий
	абс.	%	абс.	%	
Легкие	351	89	33	63	p = 0,0003
ППН	22	5	12	23	p = 0,04
ЦНС	18	4,5	4	7	
2 и более органов	28	7	5	9	

Основным клиническим симптомом было повышение температуры тела выше 38,5 °C (86 %). При поражении легких наиболее частыми симптомами были кашель (65 %) и одышка (64 %), реже – боли в грудной клетке (14 %), бронхообструктивный синдром (10 %) и кровохарканье (8 %). Аспергиллез ППН сопровождался повышением температуры тела у 50 % больных, аспергиллез ЦНС – у 90 %.

При проведении КТ легких в большинстве случаев определяли неспецифические КТ-признаки: очаговый (38 %) или инфильтративный (27 %) процессы в одном или обоих легких. Из характерных признаков грибкового поражения легких чаще всего выявляли симптом «матового стекла» – 22 %, симптом «серпа» – 10 %, реже отмечали симптом «ореола» – 3 %.

При серологическом исследовании у пациентов с поражением легких тест на галактоманнан был положительным в БАЛ – в 31 %, сыворотке крови – в 45 %. При локализации в ЦНС тест на галактоманнан был положительным в СМЖ у 19 %, в сыворотке крови – у 61 %.

При прямой микроскопии мокроты, БАЛ, аспиратов из ППН и других биосубстратов наличие нитей септированного мицелия, делящегося под острым углом, отмечали у 20 % больных. При изолированном поражении ППН основными методами диагностики были гистологическое исследование, микроскопия и посев послеоперационного материала и аспиратов из ППН. Гистологическое подтверждение диагноза

получено у 78 % больных, микроскопия и посев были положительными у 50 %.

При посеве различные субстраты *Aspergillus* spp. были выделены в 31 % случаев (табл. 4).

Таблица 4. Особенности этиологии ИА

Возбудитель	N	Изоляты (n = 137)
<i>A. fumigatus</i>	58	42 %
<i>A. niger</i>	45	33 %
<i>A. flavus</i>	28	21 %
<i>A. ochraceus</i>	2	1,5 %
<i>A. versicolor</i>	2	1,5 %
<i>A. nidulans</i>	1	1 %
<i>A. terreus</i>	1	1 %
Два и более	16	12 %

Установлено, что основными изолятами, полученными при исследовании биосубстратов, были *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. flavus*, в единичных случаях в культуре выделяли *A. versicolor*, *A. nidulans* и *A. terreus*. Два и более вида *Aspergillus* spp. были выделены в 12 % случаев культурально подтвержденного заболевания.

Согласно критериям EORTC/MSG 2008 г., «вероятный» ИА диагностирован у 93 % больных, «доказанный» — у 7 %, из них у 5 (1 %) пациентов аспергиллез был доказан при аутопсии.

У 87 % гематологических больных до развития ИА в качестве первичной антимикотической профилактики использовали флуконазол. Эмпирическую терапию перед постановкой диагноза «инвазивный аспергиллез» проводили у 23 % больных (медиана — 7 дней). После установления диагноза антимикотическую терапию получали 98 % больных. Основными используемыми препаратами были: вориконазол (62 %), амфотерицин В дезоксихолат (34 %), итраконазол (29 %), реже — каспифунгин (17 %) и позаконазол (5 %), в единичных случаях применяли липосомальный комплекс амфотерицина В и изавуконазол. Последовательно использовали в терапии 2 и более антимикотических препарата у 62 % больных, комбинированную антифунгальную терапию получали 8 % пациентов. Хирургическое лечение применили у 4 % больных. Вторичную антифунгальную профилактику для предотвращения рецидива ИА после ПХТ и алло-ТГСК проводили у 13 % пациентов.

Общая выживаемость (ОВ) в течение 12 нед составила 83 %.

Анализ выживаемости больных в периоды 1998–2006 гг. и 2007–2013 гг. выявил достоверное улучшение показателей 12-месячной ОВ за последние 5 лет ($p = 0,004$) (рис. 1).

Положительными прогностическими факторами 12-недельной выживаемости являлись: применение

вориконазола в качестве антимикотической терапии ($p = 0,002$) (рис. 2) и вторичная антимикотическая профилактика ($p = 0,0003$).

Кроме того, использование фибробронхоскопии и, соответственно, ранняя диагностика ИА достоверно улучшали показатели ОВ ($p = 0,01$). При анализе влияния вида возбудителя на ОВ достоверных результатов получено не было.

Отрицательным прогностическим фактором 6-месячной выживаемости был рецидив основного заболевания на момент развития микотической инфекции ($p = 0,02$).

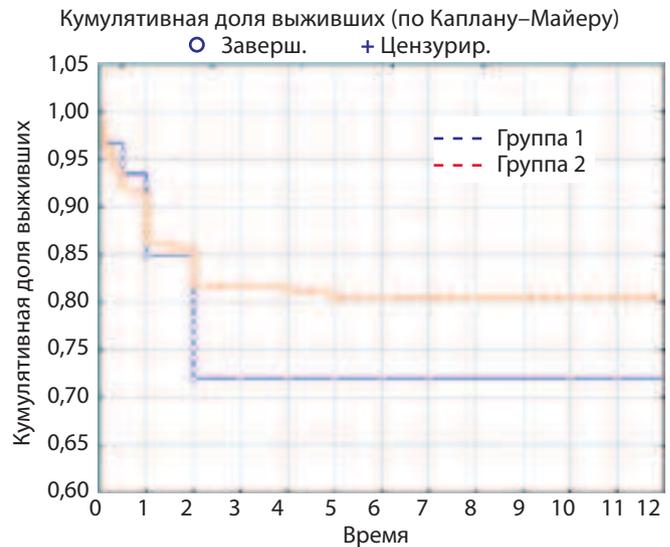


Рис. 1. ОВ пациентов с ИА в различные периоды наблюдения: группа 1 — 1998–2006 гг.; группа 2 — 2007–2013 гг.

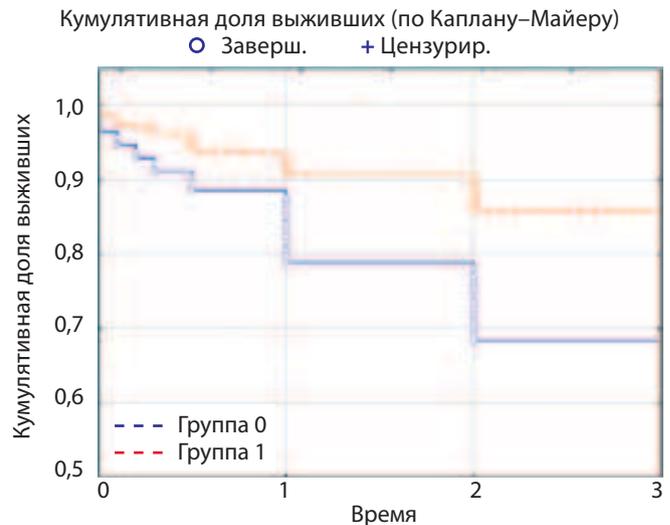


Рис. 2. Зависимость 12-недельной ОВ от антимикотической терапии: группа 1 — лечение вориконазолом; группа 0 — лечение другими антимикотиками

Обсуждение

ИА наиболее часто осложняет течение гематологических заболеваний и составляет от 60 до 82 % всех инвазивных микозов у этой группы больных [2, 3]. У ВИЧ-инфицированных пациентов частота возник-

новения ИА составляет 0,4–4 %, а на поздних стадиях возрастает до 12 % [4, 5]. В проведенных ранее исследованиях выявлен высокий риск развития ИА у больных, страдающих ХОБЛ, – 1–10 % и реципиентов органов и тканей – 0,3–14 % [6, 7]. Несмотря на раннюю диагностику и антифунгальную терапию летальность остается высокой и при различных клинических вариантах ИА – она варьирует от 48 до 92 % [8].

Впервые в России мы провели проспективное многоцентровое исследование факторов риска, этиологии, основных клинических признаков, применяемых методов диагностики и лечения ИА. В регистр больных ИА были включены 445 пациентов с «доказанным» и «вероятным» ИА (EORTC/MSG 2008 г.), госпитализированных в период с 1998 по 2013 г. в различные стационары г. Санкт-Петербурга. Регистр включает около

200 показателей (пол, возраст, основное заболевание, факторы риска, сведения об антимикотической терапии и антифунгальной профилактике, клинические проявления, локализацию микотической инфекции, изменения на КТ и магнитно-резонансной томографии, данные серологических и микологических исследований биосубстратов, выживаемость, иммунологические показатели).

Анализируя демографические показатели, мы выявили, что ИА развивается в основном у взрослого населения (средний возраст больных – 36 лет). По данным нашего регистра, взрослые пациенты составили 80 %, дети – 20 %, мужчин и женщин примерно поровну.

Мы сравнили полученные нами данные с результатами подобных исследований, проведенных в других странах (табл. 5).

Таблица 5. Данные исследований, проведенных в других странах

	Россия (1998–2013 гг.), n = 445, %	Франция [9] (2005– 2007 гг.), n = 424, %	Франция [10] (2004– 2009 гг.), n = 127, %	Италия [11] (2004– 2007 гг.), n = 140, %
«Доказанный» ИА	7	15	13	25
«Вероятный» ИА	93	85	87	75
Демографические показатели				
Взрослые	80	93	100	
Дети	20	7	–	
Мужчины	55	62	55	64
Женщины	45	38	45	36
Фоновые заболевания				
Гематологические заболевания от общего числа больных	88	78	100	100
Острые лейкозы	51	35	90	100
ОМЛ	29	30	76	100
ОЛЛ	22	5	14	
Другие гематологические заболевания	12		13	–
Хронические лимфопролифе- ративные заболевания	25	21,6	10	–
Из них лимфомы	17	10	2	
Хронические заболевания легких	3	2,3	–	–
Системные воспалительные заболевания	1	4,6	–	–
Другие	8	2,5	–	–
Факторы риска				
Алло-ТГСК	29	21,4	16	–
Трансплантация органов	1	8,7	–	–
Агранулоцитоз	64	Нет данных	86	93
Локализация микотического процесса (изолированное поражение)				
Легкие	91 (86)	92 (82)	86	90
ЦНС	5 (2)	4	2	
ППН	8 (3)	4	5	4
Другие локализации	1		–	2
2 органа и более	8	10	9	4

Демографические показатели оказались сходными. Анализ фоновых заболеваний выявил, что ИА наиболее часто развивается у пациентов с острым лейкозом. Реципиенты алло-ТГСК составили от 16 до 29 %, у этой категории пациентов, по нашим данным, ИА чаще развивался в раннем посттрансплантационном периоде (71 %), в то время как по результатам исследования O. Lortholary et al. у 68 % больных ИА развился в позднем посттрансплантационном периоде [9]. Проведенные исследования демонстрируют, что основным фактором риска является длительный агранулоцитоз, который наблюдали у большинства больных.

Клинические признаки ИА неспецифичны и зависят от локализации инфекционного процесса. Лихорадка является частым проявлением (86 %), но может отсутствовать у пациентов с РТПХ, получающих глюкокортикостероидную терапию, так как при этом угнетается продукция провоспалительных цитокинов [12].

Наши результаты свидетельствуют, что наиболее часто при ИА развивается поражение легких, реже диагностировали поражение ППН, ЦНС и других органов, а также диссеминацию процесса. По данным нашего регистра, легочная локализация у гематологических больных составила 89 %, у остальных пациентов – 63 %. Другие исследователи получили сходные результаты, например, среди пациентов с ОМЛ, по данным исследования, проведенного в Италии [11], поражение легких развивалось у 90 % обследуемых.

КТ является обязательным методом диагностики ИА. Однако следует подчеркнуть, что в большинстве случаев мы выявляли неспецифические КТ-признаки: инфильтративный или очаговый процесс в одном или обоих легких. Из специфических признаков грибкового поражения легких чаще всего выявляли симптом «матового стекла» – 22 %, относительно редкими признаками были симптом «серпа» и симптом «ореола». По данным проспективного многоцентрового исследования, симптом «ореола» у пациентов с гемобластомами выявляли в 9–15 % случаев [9].

Мы впервые показали, что применение бронхоскопии для диагностики ИА достоверно повышает эффективность лечения ($p = 0,01$). Фибробронхоскопию проводили у 76 % пациентов с легочной локализацией ИА. При исследовании БАЛ частота положительного результата теста на галактоманнан составила 69 %, выявления *Aspergillus* spp. при посеве – 43 %, обнаружения мицелия *Aspergillus* spp. при микроскопии – 31 %. По данным исследования M.-C. Nicolle et al., тест на галактоманнан в БАЛ был положительным у 20 % исследуемых, у 15 % выявлен мицелий грибов при микроскопии и у 21 % была выделена культура *Aspergillus* при посеве [10].

Основными возбудителями ИА являются *A. fumigatus* – 79, 55, 56 % [9–11], *A. flavus* – 4, 17, 29 % и *A. niger* – 4, 6, 14,5 % соответственно. Значительно реже выделяли *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*

и *A. terreus*. В нашем исследовании основными изолятами были *A. fumigatus* (42 %), *A. niger* (33 %) и *A. flavus* (21 %).

В соответствии с критериями EORTC/MSG 2008 г., в нашем исследовании «доказанный» и «вероятный» ИА диагностировали у 7 % и 93 % больных соответственно. Подобные данные получены другими исследователями (см. табл. 5).

Согласно международным рекомендациям (EORTC, 2008), антимикотическую терапию пациентам проводили с момента установления диагноза «инвазивный аспергиллез». При анализе данных регистра было показано, что для лечения ИА наиболее часто использовали вориконазол (62 %), амфотерицин В дезоксихолат (34 %) и итраконазол (29 %), реже – каспифунгин и позаконазол, комбинированную терапию получали 8 % больных. Эффективность применения вориконазола доказана в более ранних исследованиях [13]. Полученные нами результаты еще раз подтвердили, что использование данного препарата достоверно улучшает выживаемость больных ИА ($p = 0,002$). В Италии у гематологических пациентов в качестве первой линии терапии использовали вориконазол (28 %), липосомальный комплекс амфотерицина В (27 %), каспифунгин (21 %), комбинированную терапию получали 16 % [9]. Эффективность терапии также была наиболее высока при лечении вориконазолом.

По нашим данным, ОВ в течение 12 нед составила 83 %. Анализ выживаемости больных в периоды 1998–2006 гг. и 2007–2013 гг. выявил достоверное улучшение показателей 12-месячной ОВ за последние 5 лет ($p = 0,004$). В подобных исследованиях показано снижение показателей общей летальности в течение 12 нед за период 2004–2009 гг. [10].

Вторичную антифунгальную профилактику, согласно Российским национальным рекомендациям [14], проводили для предотвращения рецидива ИА пациентам, получающим высокодозную цитостатическую ПХТ в периоды выраженной нейтропении, а также реципиентам алло-ТГСК с анамнестическими данными о наличии инвазивного микоза, начиная с режима кондиционирования и в период иммуносупрессивной терапии. Использование антифунгальных препаратов для вторичной профилактики ИА при повторных эпизодах агранулоцитоза и длительной иммуносупрессивной терапии положительно влияют на ОВ ($p = 0,0003$).

Выводы

1. ИА возникает преимущественно у онкогематологических больных (88 %); в структуре фоновых заболеваний преобладают ОМЛ и ОЛЛ.

2. Основными факторами риска развития ИА являются длительный агранулоцитоз (64 %), цитостатическая ПХТ (57 %), лимфоцитопения (46 %), применение системных глюкокортикостероидов (45 %), а также алло-ТГСК (29 %).

3. Основные возбудители ИА – *A. fumigatus* (42 %), *A. niger* (33 %), *A. flavus* (21 %).
4. Наиболее частой клинической формой ИА является поражение легких (86 %).
5. ОВ в течение 12 нед составила 83 %.

6. Ранняя диагностика (проведение фибробронхоскопии; $p = 0,01$) и адекватная терапия (применение вориконазола; $p = 0,002$), а также вторичная антимикотическая профилактика ($p = 0,0003$) достоверно улучшают показатели выживаемости больных ИА.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46(12):1813–21.
2. Kousha M., Tadi R., Soubani A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* 2011;20(21):156–72.
3. Попова М.О., Зубаровская Л.С., Клишко Н.Н., Афанасьев Б.В. Инвазивные микозы при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Тер архив* 2012;7:50–7.
4. Baddley J.W. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *ISHAM Medical Mycology* 2011;49(1):7–12.
5. Клишко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей, 2-е издание, 2008. С. 206.
6. Kleinkauf N., Verweij P.E., Arendrup M.C. et al. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. Technical report of the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) – 2013. Stockholm: ECDC; 2013. Pp. 4–6.
7. Singh N., Husain S.; AST Infectious Diseases Community of Practice. Invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9(4):S180–91.
8. Zmeili O., Soubani A. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *OJM* 2007;100(6):317–34.
9. Lortholary O., Gangneux J.-P., Sitbon K. et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). *Clin Microbiol Infect* 2011;17(12):1882–9.
10. Nicolle M.C., Bénét T., Thiebaut A. et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica* 2011;96(11):1685–91.
11. Pagano L., Caira M., Candoni A. et al. Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. *Haematologica* 2010;95(4):644–65.
12. Drgona L., Colita A., Klimko N. et al. Triggers for driving treatment of at-risk patients with invasive fungal disease. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(3):17–24.
13. Herbrecht R., Denning D.W., Patterson T.F. et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347(6):408–15.
14. Противогрибковая профилактика при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Российские национальные рекомендации (под ред. Л.С. Зубаровской, Н.Н. Клишко, Г.А. Клясовой, А.А. Масчана). М., 2010.

Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии*

А.Д. Кулагин¹, И.А. Лисуков², В.В. Птушкин³, Е.Р. Шилова⁴, Н.В. Цветаева⁵, Е.А. Михайлова⁵

¹ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва;

⁴ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург;

⁵ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва

Контакты: Александр Дмитриевич Кулагин kulagingem@rambler.ru

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) является редким приобретенным клональным заболеванием крови, развивающимся в результате соматической мутации гена фосфатидилинозитол гликана класса А (PIG-A) в стволовых кроветворных клетках. ПНГ характеризуется хроническим внутрисосудистым гемолизом, костномозговой недостаточностью, тромбозами, нарушением функции почек и другими тяжелыми клиническими синдромами. Настоящие клинические рекомендации включают определение, классификацию, методы и критерии диагностики ПНГ, показания для скрининга, оптимальную терапевтическую тактику с включением таргетного препарата экулизумаба, трансплантации костного мозга и симптоматической терапии.

Ключевые слова: пароксизмальная ночная гемоглобинурия, апластическая анемия, комплемент, гемолиз, проточная цитометрия, тромбоз, трансплантация костного мозга, экулизумаб

National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

A.D. Kulagin¹, I.A. Lisukov², V.V. Ptushkin³, Ye.R. Shilova⁴, N.V. Tsvetaeva⁵, Ye.A. Mikhailova⁵

¹First I.P. Pavlov State Medical University of St.-Petersburg, Ministry of Health of Russia;

²I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg;

³Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow;

⁴Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Russian Federal Biomedical Agency, Saint Petersburg;

⁵Hematology Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare acquired clonal blood disorder caused by somatic mutation of the phosphatidylinositol glycan complementation group A gene (PIG-A) in a hematopoietic stem cell. PNH is characterized by chronic intravascular hemolysis, bone marrow failure, thrombosis, renal dysfunction and other severe clinical syndromes. These clinical guidelines include definition, classification, methods and diagnostic criteria of PNH, indications for screening, optimal treatment including targeted therapy with eculizumab, bone marrow transplantation and symptomatic therapy.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, complement, hemolysis, flow cytometry, thrombosis, bone marrow transplantation, eculizumab

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — это редкое приобретенное клональное заболевание крови, характеризующееся хроническим внутрисосудистым гемолизом, костномозговой недостаточностью, повышенным риском развития тромботических осложнений, почечной недостаточности и легочной гипертензии. В основе этиологии ПНГ лежит соматическая мутация в X-сцепленном гене фосфатидилинозитол гликана класса А (PIG-A), приводящая к дефициту гликозилфосфатидилинозитоловой «якорной» структуры, которая осуществляет фиксацию широкого спектра белков на мембранах клеток крови. Отсутствие этих связанных с мембраной белков, в частности CD55 и CD59, нарушает регуляцию системы комплемента и приводит к выраженному хрониче-

скому внутрисосудистому комплемент-опосредованному гемолизу.

Ранняя диагностика ПНГ играет важнейшую роль в своевременном назначении эффективного лечения. Однако гетерогенность клинических симптомов и редкость данного заболевания, как правило, приводят к удлинению сроков диагностики, тяжелой инвалидизации пациентов и повышению риска угрожающих жизни осложнений и смертности.

Данные рекомендации сформулированы Российским экспертным советом. Информация предназначена для широкого круга специалистов, включая гематологов, терапевтов, нефрологов, специалистов по диализу, гастроэнтерологов, кардиологов и хирургов. По мере накопления опыта диагностики и лечения ПНГ

* Настоящие клинические рекомендации были представлены и одобрены на заседании Национального гематологического общества 14 февраля 2014 г.

содержание данных рекомендаций будет уточняться и дополняться.

1. Определение, классификация и диагностические критерии

1.1. Определение

ПНГ — это редкое, приобретенное, жизнеугрожающее, прогрессирующее системное заболевание, характеризующееся хроническим внутрисосудистым гемолизом. ПНГ ассоциируется со значительным повышением риска смерти, развитием артериальных и венозных тромбозов, поражением внутренних органов и резким снижением качества жизни пациентов. Крупнейшие эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что несмотря на проведение современной сопроводительной терапии 35 % пациентов с классической формой ПНГ погибают в течение первых 5 лет после установления диагноза, а через 10 лет летальность достигает 50 % [1, 2]. От 40 до 67 % летальных исходов при ПНГ обусловлены тромботическими осложнениями [2–6]. К другим тяжелым осложнениям данного заболевания относятся почечная недостаточность, легочная гипертензия, боли в грудной клетке и животе, выраженная общая слабость, дисфагия, эректильная дисфункция [6, 7].

Главным патогенетическим механизмом развития ПНГ, обуславливающим органные поражения и летальность, является нарушение регуляции системы комплемента. Система комплемента — часть врожденного иммунитета, она подразделяется на 2 ключевых этапа активации: проксимальный и дистальный (терминальный) [8]. Проксимальный этап включает 3 основных пути активации комплемента: классический, альтернативный и лектиновый. Все пути активации ведут к важнейшему этапу — формированию C3-конвертазы, белка, расщепляющего C3 на C3a и C3b. Компонент C3b принимает участие в образовании C5-конвертазы, которая, в свою очередь, расщепляет C5-компонент комплемента на C5a и C5b. Белок C5a является провоспалительным и протромботическим, а C5b способствует формированию мембраноатакующего комплекса (МАК). Именно МАК обуславливает гемолиз эритроцитов, образование прокоагулянтных мембранных микрочастиц и активацию тромбоцитов [9–11].

В норме активация C5-конвертазы блокируется гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанным ингибитором CD55. На мембране клеток при ПНГ CD55 полностью отсутствует, либо имеет место его дефицит, что приводит к повышенному расщеплению C5. Избыточное образование C5a вызывает активацию лейкоцитов и тромбоцитов, стимулирует воспаление и развитие тромбозов. Формирование МАК на поверхности клеток в норме блокирует другой GPI-связанный ингибитор комплемента — CD59 [8, 12]. При отсутствии CD59 МАК вызывает лизис эритроцитов. Тромбоциты, лишенные CD55 и CD59, подвергаются комплементзависимой агрегации и активации [12, 13].

Метод проточной цитометрии позволяет выявить клетки с дефицитом GPI-связанных белков (GPI-AP) и является «золотым стандартом» диагностики ПНГ [14–18]. Различают 3 типа эритроцитов: эритроциты I типа с нормальной экспрессией GPI-AP на поверхности клеток, эритроциты II типа с частичной GPI-AP экспрессией и III типа с полным отсутствием GPI-AP. Наиболее информативно определение дефицита GPI-AP на лейкоцитах, особенно на гранулоцитах, что позволяет поставить точный диагноз [15]. Кроме того, у пациентов с небольшой популяцией GPI-AP дефицитных клеток данное исследование имеет смысл проводить и на моноцитах [15].

1.2. Классификация

Различают 3 основных формы ПНГ [12, 19].

1. **Классическая форма** характеризуется клинико-лабораторными признаками внутрисосудистого гемолиза без признаков других заболеваний, связанных с недостаточностью костного мозга (апластическая анемия (АА), миелодиспластический синдром (МДС), идиопатический миелофиброз).

2. ПНГ, диагностируемая у пациентов с АА (**АА/ПНГ**), МДС (**МДС/ПНГ**) и крайне редко с миелофиброзом (**идиопатический миелофиброз / ПНГ**), когда при этих заболеваниях имеются клинические и/или лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза, а в периферической крови определяется клон клеток с ПНГ-фенотипом.

3. **Субклиническая форма** заболевания (**АА/сПНГ**, **МДС/сПНГ**, **идиопатический миелофиброз / сПНГ**), диагностируемая у пациентов без клинических и лабораторных признаков гемолиза, но при наличии минорного клона клеток с ПНГ-фенотипом (как правило, < 1 %). Следует отметить, что субклиническое течение ПНГ может отмечаться и при большем размере клона.

Выделение субклинической формы ПНГ не имеет самостоятельного клинического значения, но необходимо для обеспечения мониторинга таких пациентов в связи с вероятностью нарастания размера клона и прогрессии гемолиза, который может доминировать среди клинических проявлений и требовать соответствующей терапии.

С учетом того, что субклиническая форма ПНГ при АА и/или МДС не имеет самостоятельного клинического значения, Экспертный совет в процессе обсуждения проекта рекомендаций не пришел к единому мнению о целесообразности использования термина «субклиническая пароксизмальная ночная гемоглобинурия» при формулировке диагноза и, соответственно, критерия 0,01 % лейкоцитов с дефицитом GPI-связанных белков для подтверждения диагноза ПНГ. Тем не менее все авторы консенсуса пришли к единой рекомендации о необходимости мониторингирования размера клона ПНГ, клинических и лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза у всех больных с наличием $\geq 0,01$ % лейкоцитов с дефицитом GPI-связанных белков.

Классическая форма пароксизмальной ночной гемоглинурии

У пациентов с классической ПНГ, как правило, наблюдается выраженный внутрисосудистый гемолиз с повышением уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови, ретикулоцитозом и снижением уровня гаптоглобина [12]. При данном варианте ПНГ отсутствуют дефинитивные морфологические признаки другой патологии костного мозга (АА, МДС, миелофиброз) и не характерны аномалии кариотипа [12].

Пароксизмальная ночная гемоглинурия на фоне синдромов костномозговой недостаточности (апластическая анемия / пароксизмальная ночная гемоглинурия, миелодиспластический синдром / пароксизмальная ночная гемоглинурия)

У пациентов с АА/ПНГ и МДС/ПНГ диагностируются клинико-лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза. На разных этапах развития заболевания могут превалировать симптомы недостаточности костного мозга или внутрисосудистого гемолиза, а в ряде случаев имеется их сочетание [12, 19]. Несмотря на то, что у пациентов с малым размером ПНГ-клона заболевание обычно протекает с минимальными симптомами и отмечаются только лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза, необходимо проведение мониторинга (2 раза в год). Это связано с тем, что со временем возможна экспансия клона с развитием тяжелого гемолиза и высоким риском тромботических осложнений [20, 21].

Субклиническая форма пароксизмальной ночной гемоглинурии (апластическая анемия / субклиническая пароксизмальная ночная гемоглинурия, миелодиспластический синдром / субклиническая пароксизмальная ночная гемоглинурия)

У пациентов с субклинической ПНГ отсутствуют какие-либо клинические или лабораторные признаки гемолиза. Малые популяции клеток с дефицитом GPI-AP можно обнаружить только при использовании метода высокочувствительной проточной цитометрии. Субклиническая форма ПНГ может диагностироваться на фоне заболеваний, характеризующихся нарушением функции костного мозга, в основном АА и МДС. Очень важно проводить тщательный мониторинг этих пациентов с целью выявления признаков гемолиза и экспансии клона, поскольку у 15–17 % пациентов с АА / субклинической ПНГ со временем развивается гемолитическая форма АА/ПНГ [21, 22].

1.3. Основные диагностические критерии

Метод проточной цитометрии позволяет выявить пациентов, имеющих в периферической крови клетки с дефицитом GPI-AP, что является главным отличительным признаком ПНГ (см. разд. 4 «Диагностика пароксизмальной ночной гемоглинурии»). Для более

точной диагностики исследование должно проводиться как на эритроцитах, так и на лейкоцитах (гранулоциты и моноциты). Определение количества GPI-негативных эритроцитов может быть затруднено предшествующими трансфузиями эритроцитарной массы или вследствие массивного гемолиза.

Исследование лейкоцитов, особенно гранулоцитов и моноцитов, позволяет с наибольшей точностью определить размер ПНГ-клона [12]. Для определения клинической формы ПНГ у конкретного пациента необходимо проводить клинико-лабораторную оценку параметров гемолиза и выполнить гистологический, цитологический и цитогенетический анализ костного мозга. Основные диагностические критерии, необходимые для верификации диагноза, приведены в табл. 1.

Для эффективного лечения пациентов с ПНГ важную роль играет ранняя и точная диагностика [5, 12]. Разнообразие клинических проявлений, а также редкость данного заболевания затрудняют диагностику ПНГ. В результате диагноз может быть установлен только через несколько лет после дебюта заболевания, а в отдельных случаях задержка может составлять до 10 и более лет [1, 12].

2. Дополнительные методы диагностики для оптимизации лечения

Для выбора оптимального метода лечения ПНГ необходимо оценить целый ряд факторов, влияющих на прогноз и клинические проявления заболевания. Рекомендуемый перечень исследований для пациентов с ПНГ представлен в табл. 2.

3. Показания для скрининга на пароксизмальную ночную гемоглинурию

ПНГ является редким заболеванием, часто сопровождающимся такими симптомами, как тромбозы, анемия и другие цитопении. Однако проводить скрининг на ПНГ всем пациентам с тромботическими осложнениями, анемией или цитопенией нецелесообразно, поскольку эти проявления часто встречаются и при других заболеваниях. Тем не менее всем пациентам с тромбозами в сочетании с цитопениями или внутрисосудистым гемолизом, неясными цитопениями, гемолитической анемией с отрицательной пробой Кумбса необходимо проводить скрининг на ПНГ [15, 21]. Наличие других клинических симптомов (табл. 3), как подчеркивается в рекомендациях Международного общества клинической цитометрии (ICCS) [15], значительно увеличивает вероятность выявления ПНГ-клона. Пациентам, имеющим любые из этих проявлений, показано проведение скрининга на ПНГ [12, 20, 21].

Гемоглинурия отмечается у 25–27 % пациентов с ПНГ в дебюте заболевания, все пациенты с данным симптомом должны быть обследованы на ПНГ. В течение жизни гемоглинурия той или иной степени

Таблица 1. Основные методики и цитометрические критерии, необходимые для диагностики и классификации ПНГ [12, 15]

Классическая ПНГ	<ul style="list-style-type: none"> • Проточная цитометрия для выявления клеток крови с дефицитом GPI-AP при помощи скрининговой панели с маркерами CD55 и CD59 (ретикулоциты и эритроциты), CD24/FLAER (гранулоциты), CD14/FLAER (моноциты): первичная диагностика и последующий мониторинг • Отсутствие дефинитивных признаков синдромов костномозговой недостаточности на момент диагностики или в анамнезе • Клинико-лабораторные признаки гемолиза, такие как ретикулоцитоз, повышение уровня ЛДГ, билирубина (прямого и непрямого) и снижение гаптоглобина
ПНГ на фоне заболеваний с костномозговой недостаточностью AA/ПНГ, МДС/ПНГ, идиопатический миелофиброз / ПНГ	<ul style="list-style-type: none"> • Проточная цитометрия для выявления клеток крови с дефицитом GPI-AP при помощи скрининговой панели с маркерами CD55 и CD59 (ретикулоциты и эритроциты), CD24/FLAER (гранулоциты), CD14/FLAER (моноциты): первичная диагностика и последующий мониторинг • Наличие дефинитивных признаков синдромов костномозговой недостаточности на момент диагностики или в анамнезе • Клинико-лабораторные признаки гемолиза, такие как ретикулоцитоз, повышение уровня ЛДГ, билирубина (прямого и непрямого) и снижение гаптоглобина
Субклиническая ПНГ AA/субклиническая ПНГ, МДС / субклиническая ПНГ, идиопатический миелофиброз / субклиническая ПНГ	<ul style="list-style-type: none"> • Количество клеток с дефицитом GPI клинически незначимо и может быть определено только при помощи высокочувствительной цитометрии (обычно менее 1 %) • Наличие дефинитивных признаков синдромов костномозговой недостаточности на момент диагностики или в анамнезе • Отсутствие клинико-лабораторных признаков гемолиза

Таблица 2. Дополнительные анализы, необходимые для оптимизации лечения пациентов [12]

• Медицинский анамнез с акцентом на симптомах гемоглобинурии, тромбоземболии, дисфагии, одиофагии, болях в животе и нарушении эрекции
• Проточная цитометрия: процент ПНГ эритроцитов I, II и III типов
• Определение скорости клубочковой фильтрации
• Уровень креатинина и мочевины в сыворотке крови
• Функциональные печеночные пробы
• Обмен железа (уровень сывороточного железа, общая железосвязывающая способность сыворотки, уровень ферритина)
• Концентрация фолиевой кислоты, витамина B ₁₂
• Уровень гемосидерина в моче
• HLA-типирование

выраженности отмечается, как правило, у всех пациентов с классической формой ПНГ, но при AA/ПНГ или МДС/ПНГ признаки гемоглобинурии могут отсутствовать из-за относительно небольшого размера ПНГ-клона. В связи с тем, что для ПНГ характерен внутрисосудистый гемолиз, в анализах крови практически всегда отмечается повышенный уровень ЛДГ. Таким образом, обследование на ПНГ должно быть инициировано у каждого пациента, имеющего признаки внутрисосудистого гемолиза с повышенным уровнем ЛДГ. Однако необходимо иметь в виду, что у некоторых больных уровень ЛДГ может быть незначительно повышен или даже находиться в пределах нормативных значений, несмотря на большой размер ПНГ-клона, что часто наблюдается при превалировании клеток II типа.

Таблица 3. Клинические проявления, требующие проведения скрининга на ПНГ [15]

Клинические показания
<ul style="list-style-type: none"> • Внутрисосудистый гемолиз по данным гемоглобинурии или повышению уровня гемоглобина в плазме • Необъяснимый гемолиз в комбинации с одним из следующих признаков: <ul style="list-style-type: none"> – дефицит железа – боли в животе – тромбоз – гранулоцитопения и/или тромбоцитопения • Другая приобретенная Кумбс-негативная, гемолитическая анемия (без шизоцитов в анализе крови, не связанная с инфекциями) • Тромбоз с необычными проявлениями: <ul style="list-style-type: none"> – необычная локализация: печеночные вены (синдром Бадда–Киари), другие внутрибрюшные вены (портальная, селезеночная, чревная), церебральные синусы, кожные вены – признаки сопутствующей гемолитической анемии (см. выше) – необъяснимая цитопения • Признаки недостаточности костного мозга: <ul style="list-style-type: none"> – предполагаемая или доказанная AA – МДС: рефрактерная цитопения с 1-, 2- или 3-линейной дисплазией, гипопластический вариант МДС – другие цитопении неясной этиологии после подробного обследования

Даже при отсутствии признаков гемолиза всем пациентам с AA рекомендуется проводить скрининг на ПНГ [12]. Все пациенты с AA и МДС низкого риска должны быть обследованы на ПНГ при помощи высокочувствительной проточной цитометрии [15].

Одним из самых распространенных осложнений ПНГ являются тромбозы [1, 2], хотя в зависимости от формы ПНГ заболевание диагностируется в связи с тем или иным тромботическим событием только

у 7 % пациентов [19]. Поэтому не рекомендуется проводить рутинный скрининг всем пациентам с тромбозами, за исключением случаев с необычной локализацией тромбоза (синдром Бадда—Киари, церебральный тромбоз, тромбозы вен кожи), а также при его сочетании с внутрисосудистым гемолизом, сопутствующей цитопенией или двумя этими признаками одновременно [12, 15]. Пациенты с тромбозами других локализаций, которые невозможно объяснить обычными и наиболее частыми причинами, также должны проходить скрининг на ПНГ.

От 10 до 20 % пациентов с ПНГ на момент диагностики заболевания предъявляют жалобы на боли в животе и другую симптоматику со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (дисфагия). Эти симптомы особенно распространены у пациентов с классической формой ПНГ, при которой их частота достигает 33 % [19]. В скрининге всех пациентов с подобными жалобами необходимости нет, однако тестирование должно обязательно проводиться при наличии абдоминальных болей, дисфагии в сочетании с клинико-лабораторными признаками внутрисосудистого гемолиза.

Данные по проведению скрининга в различных группах пациентов суммированы в табл. 4.

Таблица 4. Частота проведения скрининговых мероприятий

Состояние/симптомы	Тестирование и мониторинг
АА	Во время диагностики и 2 раза в год при выявлении ПНГ-клона
Гипопластический МДС	Во время диагностики и 2 раза в год при выявлении ПНГ-клона
Рефрактерная цитопения с 1-, 2- или 3-линейной дисплазией	Во время диагностики и 2 раза в год при выявлении ПНГ-клона
Тромбоз	При необычной локализации и/или наличии или ухудшении внутрисосудистого гемолиза или сопутствующей цитопении
Боли в животе или жалобы со стороны ЖКТ	При наличии или усилении клинико-лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза
Внутрисосудистый гемолиз и повышение уровня ЛДГ	Если при обследовании не удалось выявить причину данных изменений или при ухудшении данных проявлений
Размер ПНГ-клона > 1 %	Два раза в год или незамедлительно при ухудшении клинического состояния

4. Диагностика пароксизмальной ночной гемоглобинурии

4.1. Проточная цитометрия

При подозрении на ПНГ метод проточной цитометрии позволяет установить точный диагноз [15, 16]. Проточная цитометрия является наиболее чувствительным и информативным методом. Для диагностики и мониторинга ПНГ следует использовать рекоменда-

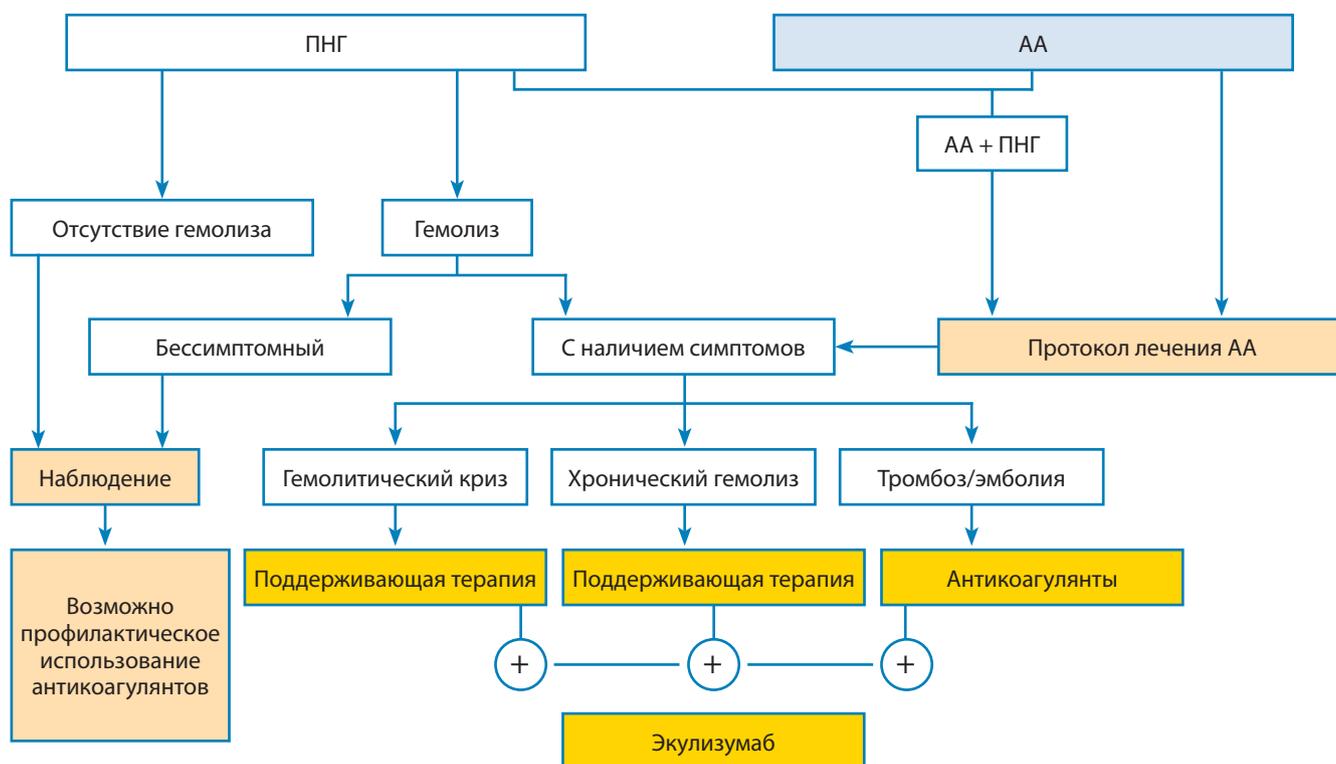
ции ICCS 2010 г. Методические аспекты диагностики изложены в специализированной литературе [15].

При выявлении клона $\geq 0,01$ % лейкоцитов с полным или частичным дефицитом GPI-связанных белков, т. е. количество клеток с ПНГ-фенотипом или размер ПНГ-клона составляет $\geq 0,01$ %, пациенты подлежат последующему наблюдению и мониторингу размера клона [15]. Мониторинг размера клона при исходном значении < 1 % достаточно проводить с частотой 1 раз в год, при наличии клона ≥ 1 % дальнейшие контрольные измерения следует проводить с частотой 2 раза в год.

При первичной диагностике и для исключения врожденного изолированного дефицита одного из GPI-связанных белков необходимо провести исследование 2 или более GPI-связанных белков [12]. Пациентам со стабильным течением заболевания и размером клона < 1 % исследование периферической крови на экспрессию GPI-AP достаточно проводить 1 раз в год. Однако, поскольку размер клона может увеличиваться со временем, пациентам с клоном ≥ 1 % мониторинг следует проводить не реже 1 раза в 6 мес [21]. Более того, при клиническом ухудшении, развитии тромбоэмболических осложнений или усилении гемолиза исследование необходимо повторить немедленно. Принимая во внимание то обстоятельство, что клон со временем может уменьшаться или даже исчезать, анализ следует проводить и при клиническом улучшении [14]. Данная рекомендация базируется на том, что тромботическая активность зависит от размера ПНГ-клона, поэтому уменьшение количества гранулоцитов с дефицитом GPI-связанных белков может потребовать изменений в профилактической антикоагуляционной терапии (см. разд. 5 «Лечение пароксизмальной ночной гемоглобинурии») [23–25].

Диагностику ПНГ могут затруднять предшествующие трансфузии эритроцитарной массы, поскольку при трансфузиях увеличивается количество эритроцитов с нормальной экспрессией CD55 и CD59, что, в свою очередь, отражается на результатах проточной цитометрии. В связи с этим для определения точного количества эритроцитов с дефицитом GPI-AP проточную цитометрию рекомендуется проводить в свободный от трансфузий период либо через 2 нед после трансфузии, либо непосредственно перед ней [12]. Анализ дефицита белков GPI-AP рекомендуется проводить как на эритроцитах, так и на лейкоцитах, поскольку ПНГ-эритроциты лизируются под действием комплемента, изменяя общий размер клона. В отличие от эритроцитов продолжительность жизни ПНГ-лейкоцитов не отличается от продолжительности жизни лейкоцитов здоровых людей [26]. Поэтому точный размер клона ПНГ определяют по значению тестирования гранулоцитов или моноцитов.

Проточная цитометрия позволяет не только идентифицировать популяцию клеток с дефицитом GPI-связанных белков, но также способна определить про-



Алгоритм терапии пациентов с ПНГ

цент патологических клеток и отдельные популяции с различной степенью дефицита GPI-связанных белков, особенно на эритроцитах.

Метод высокочувствительной проточной цитометрии позволяет выявить клоны размером 0,01 % [15]. Всем пациентам с АА или рефрактерной цитопенией с 1-, 2- или 3-линейной дисплазией рекомендуется проводить высокочувствительную проточную цитометрию при диагностике заболевания и затем 1–2 раза в год, даже при отсутствии явных клинико-лабораторных признаков гемолиза [12]. Эта рекомендация обусловлена тем, что размер клона со временем меняется, и наличие даже небольшой популяции клеток с дефицитом GPI-AP у этих пациентов имеет прогностическое значение и влияет на выбор терапии [12, 27, 28]. Так, наличие ПНГ-клеток при АА или МДС без повышения числа бластных клеток, как было показано в ряде исследований, является благоприятным прогностическим признаком при проведении иммуносупрессивной терапии [28–30].

Одним из лучших реактивов для определения ПНГ-клона среди лейкоцитов является FLAER (флуоресцентно меченный аэролизин), связывающийся непосредственно с GPI-якорем [12, 15, 18, 31, 32]. По сравнению с антителами к другим GPI-связанным антигенам, образование связи между FLAER и GPI-якорем меньше зависит от стадии созревания клетки [15]. Кроме того, для выявления ПНГ-клонов FLAER можно использовать в многоцветных комбинациях с моноклональными антителами к GPI-связанным и не-GPI-

связанным антигенам [33]. Однако данный метод нельзя применять для анализа эритроцитов, поскольку в условиях, требуемых для проведения метода, реагент плохо связывается с эритроцитами человека по еще недостаточно изученной причине.

4.2. Другие методы диагностики

Такие методы, как сахарозный тест и тест Хема (лизис эритроцитов при снижении pH сыворотки), имеют лишь исторический интерес и в настоящее время для диагностики ПНГ не используются, поскольку они недостаточно чувствительны по сравнению с проточной цитометрией [12].

5. Лечение пароксизмальной ночной гемоглобинурии

Общий алгоритм лечения больных ПНГ в зависимости от формы заболевания и степени выраженности гемолиза представлен на рисунке.

5.1. Экулизумаб

Пациентам с комплемент-опосредованным гемолизом может быть показана терапия экулизумабом (Солирис®, Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT). Экулизумаб – гуманизированное моноклональное антитело, связывающееся с C5-компонентом комплемента. Это препятствует расщеплению C5 на C5a и C5b, за счет чего угнетается образование провоспалительных цитокинов (через C5a) и МАК (через C5b) [34]. В клинических исследованиях и при последующем использовании препарата было показано, что применение

экулизумаба у пациентов с ПНГ приводит к значительному уменьшению гемолиза, частоты тромбозов, трансфузионной зависимости и выраженности таких симптомов, как одышка, слабость и легочная гипертензия. Кроме того, экулизумаб способствует улучшению функции почек и повышению качества жизни пациентов, а при долгосрочном применении увеличивает продолжительность жизни до сравнимой по возрасту в общей популяции [35–39]. Хотя использование данного препарата не приводит к излечению от заболевания, экулизумаб обладает очень хорошим профилем безопасности при длительном применении и позволяет значительно снизить частоту осложнений и смертность пациентов с ПНГ.

При определении показаний к назначению экулизумаба необходимо учитывать клинические и лабораторные признаки. Экулизумаб может быть рекомендован для включения в программу лечения следующих категорий пациентов с ПНГ:

- наличие тромботических осложнений;
- хронический гемолиз, сопровождающийся нарушением функции органов и систем;
- трансфузионная зависимость вследствие хронического гемолиза;
- беременность у пациенток с ПНГ.

При наличии тромботического осложнения в анамнезе экулизумаб показан для предотвращения развития последующих тромбозов.

Риск осложнений ПНГ, в том числе угрожающих жизни, значительно возрастает при повышении уровня ЛДГ $> 1,5$ верхней границы нормы. Поэтому в случае сочетания хронического гемолиза с уровнем ЛДГ $> 1,5$ верхней границы нормы и таких проявлений, как тромботические осложнения, анемический синдром, острая или хроническая почечная недостаточность, легочная гипертензия, признаки дистонии гладкой мускулатуры (например, абдоминальные боли, дисфагия, эректильная дисфункция и т. д.), следует рекомендовать применение экулизумаба.

Экулизумаб также показан при наличии трансфузионной зависимости вследствие хронического гемолиза. Применение экулизумаба блокирует гемолиз и способствует значительному снижению числа гемотрансфузий.

В случае беременности у пациентки с ПНГ риск осложнений, в особенности тромботических, усиливается многократно. Поэтому в данном случае, даже если до беременности экулизумаб не был показан, нужно начать лечение препаратом и продолжать его как минимум до 3 мес после родоразрешения. Затем состояние пациентки и риск осложнений следует оценить повторно для решения вопроса о возможном прекращении лечения экулизумабом. *См. также разд. «Беременность при пароксизмальной ночной гемоглобинурии».*

При решении вопроса о назначении экулизумаба рекомендуется проведение врачебного консилиума.

Дозовый режим применения экулизумаба подробно описан в инструкции по медицинскому приме-

нию. Рекомендованный режим лечения был одобрен к применению на основании результатов долгосрочной исследовательской программы препарата. В исследованиях была доказана важность соблюдения рекомендуемой дозы и интервалов введения экулизумаба при длительной терапии, так как длительное лечение дает наилучшие результаты за счет постоянного подавления неконтролируемой активности терминального пути комплемента [39].

«Прорывной» гемолиз

Стандартная схема терапии экулизумабом достаточна для полной и стабильной блокады комплемент-опосредованного гемолиза. У некоторых пациентов из-за особенностей метаболизма препарата или при инфекциях может развиваться «прорывной» гемолиз. В этой ситуации признаки гемолиза возникают за 2–3 дня перед очередным введением экулизумаба. У больных могут развиваться гемоглинурия, возвращаться исходные симптомы (одышка, слабость, спазм гладкой мускулатуры и др.), потребность в трансфузиях, повышаться уровень ЛДГ, ретикулоцитов и снижаться уровень гаптоглобина.

Лечение «прорывного» гемолиза предполагает сокращения интервала между введениями экулизумаба до 12 дней или увеличения дозы до 1200 мг на 1–2 введения.

Наблюдение за пациентами, получающими экулизумаб

Во время лечения экулизумабом необходимо контролировать появление симптомов инфекции и при бактериальных инфекциях своевременно назначать антибиотики. При диагностировании менингококковой инфекции очередное введение препарата отменяется. Механизм действия препарата экулизумаб предполагает повышение риска развития менингококковой инфекции (*Neisseria meningitidis*) на фоне его применения. Всем больным необходимо проводить вакцинацию против менингококка за 2 нед до начала применения препарата, а также ревакцинацию согласно существующим в РФ стандартам. Наиболее предпочтительна конъюгированная тетравалентная вакцина против серотипов А, С, Y и W135. В случае необходимости срочного лечения экулизумабом невакцинированного пациента возможно начало терапии на фоне соответствующей антибиотикопрофилактики, которая должна продолжаться в течение 2 нед после проведения вакцинации против менингококковой инфекции.

В процессе терапии экулизумабом рекомендуется проводить следующие лабораторные анализы: клинический анализ крови с определением ретикулоцитов, ЛДГ, креатинин крови, мозговой натрийуретический пептид В (при возможности выполнения), D-димер, сывороточное железо, ферритин, прямой антиглобулиновый тест. Контроль величины ПНГ-клона проводится на основании результатов высокочувствительной проточной цитометрии.

Симптоматическая терапия при лечении экулизумабом включает назначение фолиевой кислоты (5 мг/сут), витамина В₁₂ (при дефиците), препаратов железа (при дефиците), антикоагулянтов (варфарин, низкомолекулярный гепарин (НМГ)) при тромботических осложнениях, трансфузий препаратов крови в зависимости от клинических симптомов, гидратации при развитии гемолитического криза. Препараты железа должны назначаться с осторожностью в связи с возможностью усиления гемолиза.

Беременность при пароксизмальной ночной гемоглобинурии

Беременность при ПНГ характеризуется высокой частотой осложнений, материнской и детской смертностью. Показано совместное ведение беременности акушерами-гинекологами и гематологами, повышение дозы препарата в III триместре беременности и при «прорывном» гемолизе (до 900 мг в неделю), профилактическая антикоагулянтная терапия (НМГ), назначение фолиевой кислоты, препаратов железа, трансфузии эритроцитов и тромбоцитов при необходимости.

Экулизумаб не обнаруживается в грудном молоке и пуповинной крови.

5.2. Трансплантация костного мозга

В то время как экулизумаб позволяет контролировать внутрисосудистый гемолиз и связанные с ним осложнения ПНГ, аллогенная трансплантация костного мозга (ТКМ) остается единственным радикальным методом, позволяющим добиться излечения при данном заболевании. Однако ТКМ сопряжена с высокой летальностью. Так, в ретроспективном исследовании на 26 пациентах с ПНГ из Италии, получивших ТКМ, 10-летняя выживаемость составила 42 %, а вероятность 2-летней выживаемости у 48 пациентов, получивших ТКМ от HLA-идентичного сиблинга, по данным Международного регистра трансплантации костного мозга, составила 56 % [40, 41]. Вне зависимости от показаний, по которым проводится ТКМ, частота осложнений остается очень высокой. Частота реакции «трансплантат против хозяина» у пациентов с ПНГ составляет 42–54 % [40, 42], у половины пациентов развивается веноокклюзионная болезнь печени [43], и, кроме того, сохраняется риск экспансии ПНГ-клона [44]. ТКМ и связанные с ней осложнения негативно влияют на качество жизни пациентов [45, 46].

В связи с этим классическая форма ПНГ, в том числе с тромботическими осложнениями, в настоящее время больше не является показанием для ТКМ. Недавно были опубликованы результаты ретроспективного многоцентрового анализа ТКМ у 211 пациентов, проведенного Европейской группой трансплантации костного мозга и Французским обществом гематологов [47]. Общая 5-летняя выживаемость трансплантированных пациентов с ПНГ составила $68 \pm 3 \%$ ($54 \pm 7 \%$ в группе больных с классической ПНГ, трансплантированных в связи с тромботическими осложнениями; $69 \pm 5 \%$ у пациентов с АА/ПНГ без анамнеза тромботических событий и $86 \pm 6 \%$ в группе пациентов с классической ПНГ, у которых показанием для ТКМ был рецидивирующий гемолиз). Кроме того, был проведен сравнительный анализ общей выживаемости 24 пар больных ПНГ с тромбозами в анамнезе, получивших и не получивших ТКМ. Выживаемость больных в группе ТКМ была достоверно ниже. Эти данные убедительно показывают, что тромботические осложнения также не могут быть показанием для ТКМ. В связи с этим ТКМ проводится в рамках стандартных показаний при аплазии кроветворения (АА/ПНГ и АА/субклиническая ПНГ), редких случаях клональной трансформации ПНГ в МДС / острый лейкоз или при наличии однойцевого близнеца [3].

5.3. Антикоагулянтная терапия

После тромботического события может быть рекомендована длительная (пожизненная) терапия антикоагулянтами (производные кумарина или гепарины). Терапия синдрома Бадда–Киари требует нахождения пациента в специализированном хирургическом отделении для проведения локального и системного тромболитика. Антикоагулянтная терапия для первичной профилактики тромбозов может быть показана в отдельных случаях при выявлении ПНГ-клона в $\geq 50 \%$ гранулоцитов и при наличии дополнительных рисков тромботических осложнений, за исключением больных с аплазией костного мозга [23].

Благодарность

Авторы выражают благодарность профессору Питеру Хиллмену (Университетский госпиталь св. Джеймса, Лидс, Великобритания) за участие в обсуждении и составлении данного документа.

ЛИТЕРАТУРА

- Hillmen P., Lewis S. M., Bessler M. et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995;333:1253–8.
- Socié G., Mary J. Y., de Gramont A. et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet* 1996;348(9027):573–7.
- Kelly R., Richards S., Hillmen P., Hill A. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and treatment with eculizumab. *Ther Clin Risk Manag* 2009;5:911–21.
- McKeage K. Eculizumab: a review of its use in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Drugs* 2011;71:2327–45.
- Hillmen P., Muus P., Dührsen U. et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients

- with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007;110:4123–8.
6. Hill A., Richards S.J., Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007;137:181–92.
 7. Lee J., Jun Ho J., Sung Soo Y. et al. High prevalence and mortality associated with thromboembolism in Asian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Haematologica* 2010;95:205–6.
 8. Figueroa J.E., Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:359–95.
 9. Cappellini M.D. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;74–8.
 10. Bessler M., Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008;104–10.
 11. Woodruff T.M., Nandakumar K.S., Tedesco F. Inhibiting the C5–C5a receptor axis. *Mol Immunol* 2011;48:1631–42.
 12. Parker C., Omine M., Richards S. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106:3699–709.
 13. Parker C.J. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:21–9.
 14. Madkaikar M., Gupta M., Jijina F., Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages & limitations. *Eur J Haematol* 2009;83:503–11.
 15. Borowitz M.J., Craig F.E., Digiuseppe J.A. et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(4):211–30.
 16. Schubert J., Alvarado M., Uciechowski P. et al. Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1991;79:487–92.
 17. Höchsmann B., Rojewski M., Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol* 2011;90:887–99.
 18. Brodsky R.A., Mukhina G.L., Li S. et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114:459–66.
 19. de Latour R.P., Mary J.Y., Salanoubat C. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008;112:3099–106.
 20. Brodsky R.A. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009;113:6522–7.
 21. Movalia M.K., Weitz I., Lim S.H., Illingworth A. Incidence of PNH clones by diagnostic code utilizing high sensitivity flow cytometry. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2011;118:1033.
 22. Wanachiwanawin W., Siripanyaphinyo U., Piyawattanasakul N., Kinoshita T. A cohort study of the nature of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and PIG-A mutations in patients with aplastic anemia. *Eur J Haematol* 2006;76:502–9.
 23. Hall C., Richards S., Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003;102:3587–91.
 24. Nishimura J., Kanakura Y., Ware R.E. et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:193–207.
 25. Moyo V.M., Mukhina G.L., Garrett E.S., Brodsky R.A. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 2004;126:133–8.
 26. Brubaker L.H., Essig L.J., Mengel C.E. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1977;50:657–62.
 27. Dunn D.E., Tanawattanacharoen P., Bocconi P. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999;131:401–8.
 28. Wang H., Chuhjo T., Yasue S. et al. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002;100:3897–902.
 29. Sugimori C., Chuhjo T., Feng X. et al. Minor population of CD55–CD59–blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107:1308–14.
 30. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M. et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol* 2014;164:546–54.
 31. Brodsky R.A., Mukhina G.L., Nelson K.L. et al. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood* 1999;93:1749–56.
 32. Mukhina G.L., Buckley J.T., Barber J.P. et al. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient hematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001;115:476–82.
 33. Sutherland D.R., Kuek N., Davidson J. et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:167–77.
 34. Parker C.J. Bone marrow failure syndromes: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:333–46.
 35. Hillmen P., Hall C., Marsh J.C. et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004;350:552–9.
 36. Hillmen P., Young N.S., Schubert J. et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006;355:1233–43.
 37. Brodsky R.A., Young N.S., Antonioli E. et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008;111(4):1840–7.
 38. Kelly R.J., Hill A., Arnold L.M. et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood* 2011;117:6786–92.
 39. Hillmen P., Muus P., Roth A. et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2013;162(1):62–73.
 40. Santarone S., Bacigalupo A., Risitano A.M. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica* 2010;95:983–8.
 41. Saso R., Marsh J., Cevreska L. et al. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1999;104:392–6.
 42. de Latour R.P., Schrezenmeier H., Mary J.Y. et al. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: an ongoing joint study of the AAWP EBMT Group and the French Society of Haematology (EBMT abstract 316). *Bone Marrow Transplant* 2009;43(Suppl 1):57–8.
 43. Armitage J.O. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:827–38.
 44. Benavides Lopez E. PNH clonal expansion following bone marrow transplant: case report. *Haematologica* 2011;96:524.
 45. Fraser C.J., Bhatia S., Ness K. et al. Impact of chronic graft-versus-host disease on the health status of hematopoietic cell transplantation survivors: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* 2006;108:2867–73.
 46. Bieri S., Roosnek E., Helg C. et al. Quality of life and social integration after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:819–27.
 47. de Latour R.P., Schrezenmeier H., Bacigalupo A. et al. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2012;97(11):1666–73.

Количественный анализ химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярно-генетическими методами

В.А. Лавриненко, Т.В. Савицкая, Е.В. Волочник, Ю.Е. Марейко, О.В. Алейникова
ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск

Контакты: Виктория Александровна Лавриненко viallav@mail.ru

Количественный мониторинг химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярными методами стал обязательным диагностическим инструментом для определения степени приживления трансплантата или его отторжения, а также предсказания рецидива основного заболевания. Несмотря на широкое применение анализа химеризма, до сих пор вызывает дискуссию выбор стандартного количественного лабораторного метода для его рутинного использования. В данном исследовании мы сравнили 2 молекулярных метода определения гемопоэтического химеризма: мультиплексную полимеразную цепную реакцию коротких tandemных повторов (STR-ПЦР) с последующим фрагментным анализом и амплификацию полиморфизмов инсерция/делеция с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (InDel-ПЦР). Мы выполнили исследование химеризма у 60 пациентов с помощью STR-ПЦР и InDel-ПЦР. Для всех пар донор/реципиент были обнаружены информативные STR-аллели (100%), тогда как информативные аллели для реципиента методом InDel-ПЦР — только в 88% пар. Чувствительность STR-ПЦР и InDel-ПЦР составила 1–5% и более 0,01% соответственно. Точность определения количества была выше для STR-PCR, чем для InDel-PCR, при уровне донорского химеризма 3–97%. Таким образом, наиболее оптимальным подходом для мониторинга гемопоэтического химеризма у пациентов с уровнем химеризма менее 5% или более 95% является использование InDel-ПЦР, а при уровне химеризма 5–95% для мониторинга рекомендуется использование STR-PCR.

Ключевые слова: химеризм, короткие tandemные повторы, полиморфизмы инсерция/делеция, полимеразная цепная реакция, флуоресцентная *in situ* гибридизация, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Quantitative analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with molecular genetic methods

V.A. Lavrinenko, T.V. Savitskaya, Ye.V. Volochnik, Yu.E. Mareiko, O.V. Aleynikova

Republican Scientific Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of Republic of Belarus, Minsk

Quantitative monitoring of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) by molecular methods has become a significant diagnostic tool in detection of engraftment/graft failure, predicting rejection and disease relapse. Despite the great utility of chimerism analysis there is not a unique standard method for its quantification. The objective of the present investigation was to compare perspective methods multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction (STR-PCR) and real-time PCR insertion/deletion polymorphisms (InDel-PCR) for the quantification of chimerism after HSCT. We performed a study analyzing the chimerism status in 60 patients by STR-PCR and by InDel-PCR. Recipient/donor discrimination was possible with STR-PCR in all patient-donor pairs (100%), whereas informative alleles for recipient were found in 88% pairs with InDel-PCR. The sensitivity (detection limit) of STR-PCR and InDel-PCR was 1–5% and more than 0.01% donor cells correspondingly.

The accuracy of quantification was higher for STR-PCR than for InDel-PCR, when level of donor chimerism was 3–97%. These methods can be successfully used to determine chimerism after allogeneic HSCT. Considering the higher sensitivity and quantification accuracy of InDel-PCR it should be chosen if donor chimerism level less 5% or more 95% and in other cases STR-PCR should be chosen.

Key words: chimerism, short tandem repeats, insertion/deletion polymorphisms, polymerase chain reaction, fluorescence *in situ* hybridization, hematopoietic stem cell transplantation

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от родственных и неродственных доноров часто является единственным способом лечения различных злокачественных и незлокачественных заболеваний. Однако успех аллогенной ТГСК (алло-ТГСК) ограничивают многочисленные посттрансплантационные осложнения: отторжение трансплантата, развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), рецидивы основного заболевания. В связи с этим изучение динамики гемопоэтического химеризма и определение ее связи с перечисленными осложнениями

играет важнейшую роль для правильной оценки состояния больного и проведения дальнейших лечебных мероприятий [1]. Поэтому актуальной задачей является выбор наиболее надежных, информативных и чувствительных методик количественной оценки донорского химеризма (ДХ) после проведенной алло-ТГСК [2].

Существует ряд методов оценки химеризма, включая цитогенетические и молекулярно-биологические, в которых в качестве мишеней используют различные ДНК-маркеры (в основном повторы ДНК, а также ряд вариантов уникальных генов) [3]. Одними из наиболее

перспективных и информативных методик являются метод флуоресцентной *in situ* гибридизации – FISH (fluorescence *in situ* hybridization), метод амплификации и анализа продуктов мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) коротких tandemных повторов (STR, short tandem repeat) и ПЦР в реальном времени (например, полиморфизмов инсерция/делеция (InDel, insertion/deletion)) [4–6].

Метод FISH с помощью синтетических ДНК-зондов, гибридизируемых с искомыми участками ДНК в интерфазных ядрах, был внедрен в цитогенетическую диагностику химеризма в 90-е годы и используется при несовместимых по полу алло-ТГСК [2, 6]. Достоинство методики заключается в возможности прямого подсчета доли клеток донора и реципиента. Главным недостатком FISH-исследования является его низкая информативность (ограничена только несовместимыми по полу алло-ТГСК) [7].

Метод STR-ПЦР основан на анализе продуктов амплификации повторяющихся последовательностей ДНК – STR-повторов. Каждый STR (или микросателлит) маркер имеет характерную хромосомную локализацию и представляет собой короткую нуклеотидную последовательность ДНК (2–7 пар оснований), которая многократно tandemно повторяется от 4 до 50 раз [5].

Для амплификации STR-локусов обычно используется мультиплексная ПЦР с мечеными разными флуоресцентными красителями несколькими парами праймеров, комплементарными к последовательностям ДНК, которые фланкируют эти микросателлиты. В результате STR-ПЦР образуется набор фрагментов разной длины в зависимости от количества tandemных повторов [2]. В настоящий момент для разделения и детекции продуктов ПЦР используют фрагментный анализ методом капиллярного электрофореза. Размер ПЦР-фрагмента каждого маркера (локуса STR) и его относительное количество оценивают, исходя из показателей относительной флуоресценции и времени детекции сигнала [5]. Диагностика химеризма на основе методов, использующих STR в качестве маркера, на сегодняшний день самый широко используемый подход для анализа приживления стволовых клеток.

Главным преимуществом InDel-ПЦР по сравнению с мультиплексной STR-ПЦР при исследовании химеризма является отсутствие конкуренции в ПЦР и влияния плато реакции, и, как результат, большая чувствительность [7].

Полиморфизм инсерция/делеция (InDel) – тип генетической вариации, при которой специфическая нуклеотидная последовательность присутствует (инсерция) или отсутствует (делеция). InDel находятся в кодирующей области гена и могут быть кратны и не кратны 3 нуклеотидам, что приводит к мутациям со сдвигом рамки считывания [8].

При выборе мишеней для исследования методом InDel-ПЦР руководствуются следующими критериями: биаллельные полиморфизмы (InDel) должны от-

личаться, по крайней мере, двумя последовательными вариабельными основаниями и показывать высокий уровень гетерозиготности в популяции в целом. Для каждой биаллельной системы один из праймеров выбирают в полиморфном регионе для специфической амплификации каждого аллеля, тогда как 2-й праймер расположен в общем регионе, при этом TaqMan-проба является общей для обоих аллелей [7]. Количественная ПЦР InDel полиморфизмов обладает чувствительностью 10^{-4} (ограниченной в основном количеством ДНК в реакции), так же как и хорошей воспроизводимостью и высокой точностью [4].

Благодаря высокой чувствительности, по сравнению с обычной мультиплексной STR-ПЦР, метод InDel-ПЦР может использоваться для определения остаточных клеток реципиента у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК и может предсказать рецидив основного заболевания в значительно большем количестве случаев (практически в 2 раза чаще согласно исследованиям A. Jiménez-Velasco et al.) [4].

С учетом современных данных, целью собственных исследований стала оптимизация методов для мониторинга гемопоэтического химеризма после алло-ТГСК, на основе оценки информативности маркеров (InDel, STR-полиморфизмы, XY-маркеры) для пары донор/реципиент, сравнения чувствительности и точности количественного определения мультиплексной STR-ПЦР с последующим фрагментным анализом, InDel-ПЦР в реальном времени и FISH.

Материалы и методы

В анализ было включено 575 образцов костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) от 60 пациентов после алло-ТГСК, выполненных в 2011–2013 гг. в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии. Определение химеризма осуществляли с помощью STR-ПЦР с последующим фрагментным анализом у всех 60 пациентов (480 посттрансплантационных образцов) и InDel-ПЦР у 42 пациентов (294 посттрансплантационных образца). Скрининг методом InDel-ПЦР был проведен у всех пациентов, в анализ были включены только больные, для которых были найдены информативные маркеры для реципиента. Методом FISH было обследовано 19 пациентов (75 посттрансплантационных образцов). Взятие ПК и/или КМ для исследований проводили на +14, +21, +30, +45, +60, +80, +100, +140, +180, +245, +365-й дни и каждые последующие полгода.

Мононуклеарные клетки выделяли из ПК и КМ на градиенте плотности Histopaque (Sigma-Aldrich, США).

Выделение ДНК выполняли фенол-хлороформной экстракцией. Концентрацию и качество образцов ДНК оценивали на UV-спектрофотометре (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, США).

Оптимизация методик была выполнена на серии разведений клеток от 2 разнополюх здоровых волон-

теров, смешанных в различных пропорциях, % (100; 50; 25; 10; 5; 3; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0).

Для амплификации STR использовали коммерческий набор AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit (ABI, UK), который содержал смесь праймеров к 10 локусам STR и локусу амелогенина для мультиплексной ПЦР. Реакцию ПЦР проводили с использованием 4 нг исследуемой ДНК. Разделение продуктов ПЦР производили с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Идентификацию аллелей проводили с использованием оригинального программного обеспечения GeneMapper (Applied Biosystems, США). При несовпадении аллелей у пары донор/реципиент их рассматривали как информативные и использовали в дальнейшем для подсчета химеризма в посттрансплантационных образцах. Рассчитывали ДХ как соотношение сигналов флуоресценции информативных аллелей донора и реципиента по относительной высоте пиков:

$$\text{ДХ, \%} = (\Sigma \text{ ДНК донора}) / \Sigma \text{ общей ДНК в локусе} \times 100 \%$$

Для исследования методом InDel-ПЦР была выбрана панель праймеров, предложенная M. Alizadeh et al. [7], разработанная на основе биаллельных коротких полиморфизмов инсерций/делеций человека. В панель праймеров были также включены праймеры и зонды ACE 1428, ACE 1721, GST 194, предложенные M. Koldehoff et al. [9]. Первоначально донора и реципиента генотипировали по 22 аллель-специфическим маркерам. Аллели учитывали как позитивные, если значение Ct (пороговый цикл) было в пределах 20–26, и негативные, если значение Ct превышало 40 или отсутствовала амплификация. Аллели считали информативными, если они были позитивными для реципиента и негативными для донора или наоборот. В качестве референсного гена был выбран ген альбумина *ALB*.

ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере StepOnePlus (Life Technologies, США) в объеме 20 мкл. При уровне ДХ > 90 % диагностировали остаточные клетки реципиента по 1–2 информативным аллелям реципиента и уровень ДХ вычисляли по формуле:

$$\text{ДХ, \%} = 100 \% - \% \text{ клеток реципиента.}$$

Для определения чувствительности ПЦР в реальном времени строили калибровочную кривую для выбранных информативных аллелей донора и реципиента и контрольного гена *ALB* на основании серии разведений ДНК донора в ДНК реципиента и наоборот (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Для подсчета уровня химеризма использовали следующую формулу [7]:

$$\text{ДХ, \%} = 100 \% \times (1 + E)^{-(\Delta\text{CtU} - \Delta\text{CtC})}$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{мишени}} - \text{Ct}_{\text{ABL}},$$

где ΔCtU – значение ΔCt в неизвестном образце; ΔCtC – значение ΔCt в калибраторе (в образце до трансплантации); E – эффективность амплификации исследуемой последовательности ДНК (мишени).

Для исследований химеризма методом FISH клетки ПК/КМ подвергали краткосрочному культивированию в среде RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (термически инактивированную), глютамин и антибиотик. Затем фиксировали в смеси метанол + уксусная кислота (3:1) и окрашивали коммерческими зондами CEP X/Y Dual Color Probe (Abbott, США) по стандартной методике фирмы-производителя.

Статистическая обработка полученных нами данных проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Для оценки сопоставимости 2 методов применяли подход, предложенный Bland и Altman, для определения согласованности результатов первого и второго измерения мы вычислили коэффициент вариации парных измерений (MedCalc).

Результаты и обсуждение

Информативность аллелей. Начальный этап количественного анализа химеризма – выявление информативных аллелей, маркерных локусов, по которым различаются донор и реципиент.

При использовании метода STR-ПЦР для всех 60 (100 %) пар донор/реципиент были обнаружены информативные аллели, при этом их количество у одного и того же пациента составляло 3 и более. При родственной алло-ТГСК количество информативных аллелей в парах донор/реципиент составило 3–10 (медиана – 7), при неродственной алло-ТГСК – 7–11 (медиана – 10). Информативность отдельных локусов была высокой – от 78 % всех пар и выше, при этом информативность амелогенина, отражающего количество пар донор/реципиент, не совпадающих по полу, составила 57 % (табл. 1).

Для всех пар донор/реципиент при диагностике методом InDel-ПЦР были также обнаружены информативные аллели (100 %). Количество информативных аллелей в паре донор/реципиент составило от 1 до 11, 1–10 (медиана – 4) при родственной и 1–11 (медиана – 7) – при неродственной алло-ТГСК. Информативность отдельных локусов была не выше 51,1 % (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, информативность ряда локусов была низкой (наблюдалась неспецифи-

Таблица 1. Информативность STR-локусов в парах донор/реципиент

Локусы	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	amelogenin	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
Информативность, %	80	89	78	91	57	83	86	93	89	78	90

Таблица 2. Информативность используемых InDel-локусов

Локус	S01a	S01b	S02	S03	S04a	S04b	S05a	S05b	S06	S07a	S07b	S08a	S08b	S09a	S09b	S10a	S10b	S11a	S11b	ACE1428	ACE1721	GST194
Информативность, %	47,2	0	47,2	35,1	51,4	11,1	0	35	27	47	40,5	38,9	32,4	0	30,6	0	25	47,2	25	0	30,6	22,2

ческая амплификация до 40 цикла), такие аллели в последующем были исключены из панели праймеров (S01b, S05a, S09a, S10a, ACE 1428).

При диагностике методом InDel-ПЦР аллели могут быть информативными для донора (аллель донора амплифицируется и не амплифицируется аллель реципиента) и для реципиента (наоборот, амплифицируется только аллель реципиента). Однако при уровне ДХ > 90 % предпочтительнее его мониторировать по остаточным клеткам реципиента. При этом маркеры, специфичные для реципиента, были определены для 53 из 60 пар донор/реципиент (88,3 %). Таким образом, метод InDel-ПЦР с использованием 17 маркеров позволял дискриминировать почти в 90 % пар реципиент/донор.

В наших исследованиях мониторинг химеризма методом FISH с использованием зондов к X- и Y-хромосомам был возможен только у 57 % пар, различающихся по полу.

Таким образом, используемая панель STR-маркеров достаточна для определения гематологического химеризма при любом сочетании донора и реципиента, в то время как при использовании InDel – только у 88 % и FISH – у 57 % пар.

Чувствительность методов. С помощью серийных разведений клеток одного волонтера в клетках другого, которые различались по полу, была определена чувствительность методов, которая составила для STR-ПЦР и FISH 1 % и для InDel-ПЦР – 0,01 %. Таким образом, метод STR-ПЦР имеет невысокую чувствительность, что ограничивает его использование для

определения минимальной остаточной болезни, чувствительность для определения которой должна быть 10^{-3} – 10^{-6} [10]. Следует также упомянуть о неодинаковой эффективности амплификации отдельных локусов в мультиплексной ПЦР при выполнении STR-ПЦР, результатом которой является неодинаковая чувствительность локусов от 1 до 10 %, при этом самая низкая была у локуса FGA (табл. 3).

Мы вносили в реакцию 4 нг ДНК, что эквивалентно содержанию ДНК 450 соматических клеток (6,6 пг/клетка), отсюда теоретически возможная чувствительность метода STR-ПЦР составляет не более 2,2 %. При увеличении вносимого в реакцию количества ДНК возникает ряд артефактов (см. ниже), которые могут значительно исказить значение химеризма.

Чувствительность метода InDel-ПЦР определяли в образцах искусственных разведений клеток от 2 разнородных здоровых волонтеров, смешанных в различных пропорциях (% мужчина: 100; 50; 25; 10; 5; 3; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0), а также для каждой реакции с выбранными информативными аллелями донора и реципиента по серии разведений ДНК донора в ДНК реципиента и наоборот (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) для построения калибровочной кривой. Чувствительность метода составила 10^{-4} – 10^{-5} в зависимости от маркера. В реакцию InDel-ПЦР брали 120 нг ДНК, что соответствует приблизительно 18 000 клеток, т.е. теоретическая чувствительность метода составила 0,0056 %, т.е. значения < 0,01 % можно считать за артефакт и принимать значение химеризма за 0 %.

Таблица 3. Чувствительность метода STR-ПЦР, % в отдельных информативных локусах

Локусы	Разведения клеток						
	75	50	25	10	5	3	1
Чувствительность, %							
D3S1358	76,62	51,61	26,23	11,28	4,56	3,65	3,64
D2S1338	75,17	53,19	24,61	9,10	8,00	4,55	2,20
amelogenin	71,25	51,64	25,68	10,48	6,24	4,97	0,00
D21S11	72,45	48,16	25,50	8,50	6,69	6,83	0,00
TH01	75,56	56,00	26,10	13,05	6,87	0,00	0,00
FGA	82,21	61,54	23,97	11,62	0,00	0,00	0,00
Среднее значение	74,21 ± 3,84	52,12 ± 4,61	25,63 ± 0,89	10,48 ± 1,68	6,47 ± 2,86	4,00 ± 2,87	2,92 ± 1,58

По нашим результатам, линейность амплификации достоверно соблюдалась до разведения 10^{-4} . После разведения 10^{-4} было невозможно с высокой точностью определить значение химеризма количественно, так как в разведении 10^{-5} наблюдали разброс значений более чем на 0,5 цикла (рис. 1). Учитывая вышеизложенное, мы принимали значения менее 0,01 % клеток реципиента за 100 % ДХ.

В собственных исследованиях чувствительность метода FISH составила 1–5 %. Нужно отметить, что и по данным литературы чувствительность FISH сопоставима с STR-ПЦР в случае трансплантации от несовместимого по полу донора [5].

Таким образом, метод InDel-ПЦР имеет существенное преимущество в чувствительности перед мето-

дами STR-ПЦР и FISH, что особенно привлекательно для диагностики микрохимеризма.

Точность и воспроизводимость методов. Современные технологии на основе STR-мишеней имеют методологические особенности, которые влияют на точность измерения и могут привести к ошибкам интерпретации количественного уровня химеризма.

При применении STR-ПЦР большую погрешность в точность измерения уровня химеризма могут внести так называемые «stutter» пики, которые возникают в результате «скольжения» полимеразы в процессе амплификации или, иными словами, «перескока» полимеразы на одну повторяющуюся единицу STR. При использовании тетрануклеотидных STR они появляются на 4 нуклеотида раньше амплифицируемого

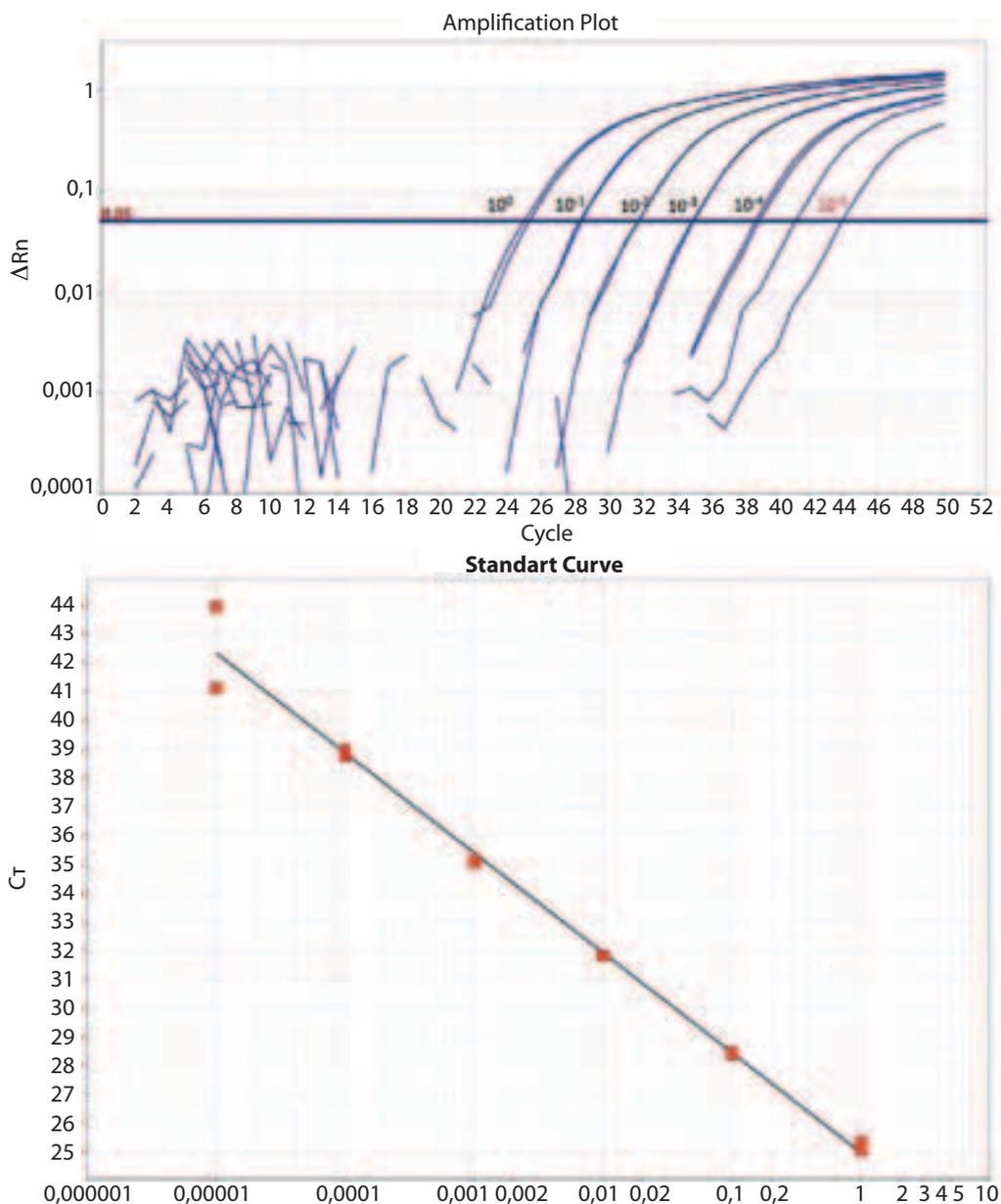


Рис. 1. Чувствительность и линейная зависимость между разведением и порогом амплификации метода InDel-ПЦР

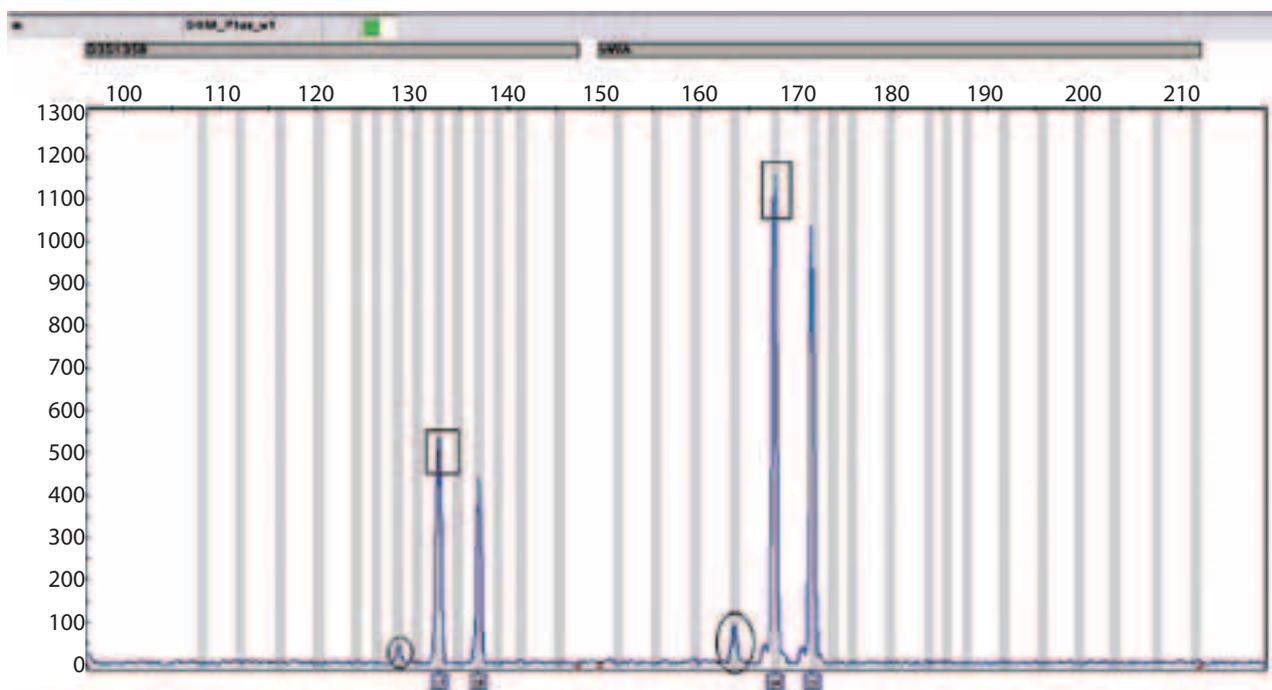


Рис. 2. Расположение «stutter» пиков для аллелей 18 и 15, 17 и 14. В кружке – «stutter» пики аллелей 17 и 14; в прямоугольнике – возможные «stutter» пики аллелей 18 и 15, которые могут делать вклад в высоту предшествующих пиков аллелей 17 и 14 соответственно

аллеля на электрофореграмме [11]. «Stutter» пики могут давать 5–15 % погрешность в высоте и площади пиков, перекрывающихся с ними по размеру, а также симулировать картину смешанного химеризма при его низком уровне, если информативный аллель реципиента одновременно мигрирует со «stutter» пиком донорского аллеля [2, 11] (рис. 2).

«Stutter»-подобные пики могут появляться также после главного пика (echo peaks) [11]. Такие локусы должны быть исключены из анализа, особенно когда четко определено наличие низкого уровня химеризма в других локусах. Эти факты следует учитывать при подсчете уровня химеризма, особенно при его очень низких значениях (стремящихся к 0 % ДХ) или при очень высоких (стремящихся к 100 % ДХ).

Разная эффективность амплификации аллелей или аллельный дисбаланс также влияет на точность метода и является общим источником вариации, приводящей к ≤ 15 % разнице в пределах пары аллелей донора или реципиента в 70–100 % случаев в зависимости от маркера [11].

Также погрешности существуют при использовании метода InDel-ПЦР. В отличие от метода STR-ПЦР, где аллели реципиента и донора амплифицируются в одной пробирке, метод InDel-ПЦР основан на использовании специфических праймеров и проб, которые амплифицируют аллели реципиента и донора в различных пробирках. При этом условия амплификации аллелей донора и реципиента наиболее оптимальны и сходны при STR-ПЦР, в то время как при InDel-ПЦР разница в условиях амплификации между дублями влияет на точность определения значения

химеризма. Допускаемая погрешность измерения порогового значения $Ct \pm 0,5$ между дублями, что соответствует вариации количества ДНК до 50 % (коэффициент вариации парных измерений – 0–50 %). При низких значениях химеризма эта погрешность незначительна, а при высоких – недопустима. Для сравнения, 100 % химеризм при измерении может давать значения между 75 % и 150 %, что непригодно для измерения химеризма, а при значении 1 % может давать значения между 0,75 % и 1,5 %, что вполне допустимо.

В 2 повторных исследованиях на серии разведений клеток мы определяли воспроизводимость используемых методов. Полученные результаты представлены в табл. 4 и на рис. 3. Как видно из данных табл. 4, наиболее точные результаты по количественному определению химеризма в серии клеточных разведений мы получили при использовании STR-ПЦР, затем FISH и менее точные – при InDel-ПЦР. Наиболее надежные результаты получены методом STR-ПЦР при уровне химеризма ≥ 3 % и ≤ 97 % ДХ (что соответствует ≥ 3 % химеризму реципиента). При использовании мультиплексной STR-ПЦР возможно независимо посчитать значение ДХ для каждого информативного локуса и среднее, для получения более точного результата, а также оценить статистическую вариабельность и надежность результатов [7]. При низких значениях химеризма (< 3 % и при определении уровня ДХ по клеткам реципиента > 97 %) коэффициент вариации для 2 молекулярно-генетических методов сопоставим (для STR-ПЦР коэффициент вариации парных измерений составляет 33,6 % при 1 % ДХ, 51,38 % – для InDel-ПЦР). Низкая точность результатов методом STR-ПЦР вне

Таблица 4. Значения химеризма, полученные методами STR-ПЦР, InDel-ПЦР и FISH на серии разведений клеток

Значение химеризма, %	Разведения клеток									
	100	75	50	25	10	5	3	1	0,1	0,01
STR-ПЦР, тест 1	100	74,21	52,12	25,63	10,48	6,47	4,00	2,92	0,00	0,00
STR-ПЦР, тест 2	100	75,31	52,58	25,57	10,58	6,05	4,47	1,80	0,00	0,00
Коэффициент вариации парных измерений		1,04	0,62	0,17	0,67	4,74	7,85	33,56		
InDel-ПЦР, тест 1	91,12	132,87	77,49	25,66	13,18	5,36	3,49	1,56	0,06	0,01
InDel-ПЦР, тест 2	96,50	59,47	42,42	20,33	6,96	3,09	1,63	0,60	0,04	0,01
Коэффициент вариации парных измерений	4,06	53,97	41,36	16,39	16,39	43,68	37,99	51,38	28,28	
FISH	100	80,3	53,3	28,3	13,3	5,7	2,3	0,67	0	0

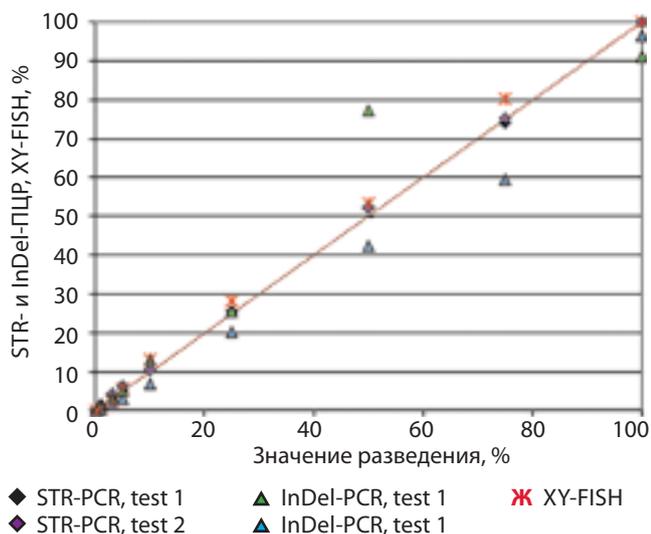


Рис. 3. Значения химеризма, полученные методами STR-ПЦР, InDel-ПЦР и FISH на серии разведений клеток

этого интервала обусловлена ограниченной чувствительностью в отдельных локусах (1–10 %).

Таким образом, методики на основе STR-ПЦР и фрагментного анализа наиболее гибкие и универсальные, и подходят для рутинного количественного определения химеризма [7]. Тем не менее главное достоинство InDel-ПЦР заключается в более высокой чувствительности, что делает возможным мониторинг химеризма при его низких (< 5 %) и высоких (> 95 %) значениях и позволяет выявлять изменения значительно раньше.

Сопоставимость результатов, полученных разными методами. Для определения сопоставимости результатов 2 методов часто используют коэффициент корреляции, но он не всегда подходит для характеристики диагностических методов. Поэтому мы использовали метод Бланда–Альтмана, который применяется для сравнения 2 методов, каждый из которых имеет собственную ошибку измерения [12, 13]. Это метод основан

на графическом представлении различия между значениями, полученными двумя методами в 1 образце, против их значения и на вычислении пределов сопоставимости (обозначают $d - 2SD$ и $d + 2SD$, где значение d – различие измерения и SD – стандартное отклонение различия). Этот метод дает ответ на вопрос, сопоставимы ли результаты, полученные двумя методами, и насколько они сопоставимы. Считается, что 2 метода коррелируют, когда различия измерений статистически несущественны, потому что они включены в 95 % доверительный интервал. Сопоставимость методов STR-ПЦР и InDel-ПЦР показана на рис. 4 для серии разведений и для клинических образцов на рис. 5.

Как видно из графиков, результаты, полученные двумя методами, хорошо сопоставимы при низких значе-

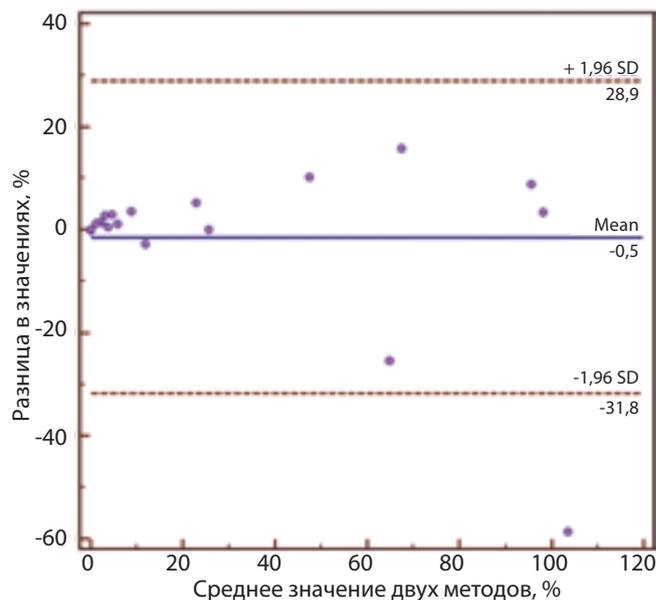


Рис. 4. Сравнение значений химеризма по Бланду–Альтману, полученных методами STR-ПЦР и InDel-ПЦР на серии разведений. График отображает разницу в значениях, полученных обоими методами против среднего значения химеризма

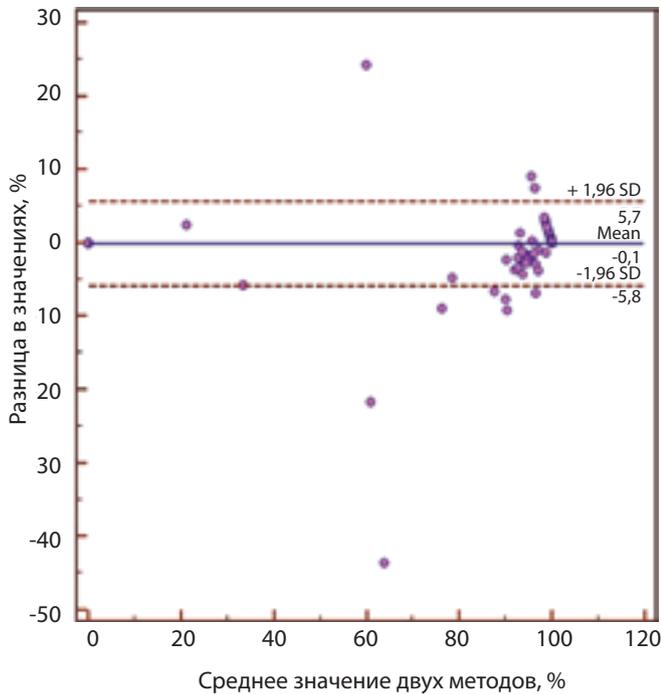


Рис. 5. Сравнение значений химеризма по Бланду–Альтману, полученных методами STR-ПЦР и InDel-ПЦР в образцах пациентов после алло-ТГСК. График отображает разницу в значениях, полученных обоими методами против среднего значения химеризма. Значения ДХ у большинства пациентов были близки к 100 %

ниях химеризма (для клинических образцов при уровне химеризма, близком к 100 % ДХ, расчет химеризма производился по остаточным клеткам реципиента, что соответствует низкому «химеризму реципиента», поэтому результаты хорошо сопоставимы в этой области). Однако при уровне химеризма, приближающемся к 50 %, как и ожидалось, наблюдается заметное расхождение результатов, полученных методом InDel-ПЦР, с другим методом из-за его низкой точности измерения в этом интервале.

Заключение

Таким образом, наиболее оптимальным подходом для мониторинга гемopoэтического химеризма у пациентов с уровнем клеток реципиента выше 5 % или с уровнем химеризма 5–95 % является использование STR-ПЦР-метода с последующим фрагментным анализом. При уровне химеризма менее 5–10 % или больше 90–95 % (в частности, после миелоаблативных режимов кондиционирования) и особенно у пациентов, для которых необходимо достижение максимально полного ДХ, для мониторинга рекомендуется использование количественной InDel-ПЦР в реальном времени как метода с более высокой чувствительностью. В других случаях, например, в отсутствие информативных маркеров, должен быть выбран метод STR-ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА

- Lion F., Watzinger S., Preuner H. et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2012;26(8):1821–8.
- Antin J.H., Childs R., Filipovich A.H. et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: Recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings of the international bone marrow transplant registry and the American society of blood and marrow transplantation. *Biol Bone Marrow Transplant* 2001;7(9):473–85.
- Чухловин А.Б., Фезе Б., Зарайский М.И. и др. Принципы молекулярно-генетической оценки гемopoэтического химеризма и области его применения в гематологии. *Вопр гематол/онкол и иммунопатол в педиатрии* 2002;1(1):70–4.
- Jiménez-Velasco A., Barrios M., Roman-Gomez J. et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphism. *Leukemia* 2005;19(3):336–43.
- Kristt D., Stein J., Yaniv I. et al. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):255–68.
- Khan F., Agarwal A. and Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(1):1–12.
- Alizadeh M., Bernard M., Danic B. et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002;99(12):4618–25.
- Rodriguez-Murillo L. and Salem R.M. Insertion/Deletion Polymorphism. In M.D. Gellman & J.R. Turner (eds.). *Encyclopedia of behavioral medicine*. New York: Springer, 2013; part 16:1076.
- Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M. et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006;81(10):735–46.
- van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901–28.
- Kristt D., Israeli M., Narinski R. et al. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. *J Biomolecular Techniques* 2005;16(4):378–89.
- Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;327(8476):307–10.
- Hanneman S.K. Design, analysis, and interpretation of method-comparison studies. *AACN Adv Crit Care* 2008;19(2):223–34.

Оптимальные сроки проведения аутологичной трансплантации клеток предшественников гемопоэза при неблагоприятном течении лимфомы Ходжкина. Зарубежные рекомендации и отечественная практика

Н.В. Жуков^{1,2}, А.Л. Усс³, Н.Ф. Миланович³, В.В. Птушкин^{1,2}, Б.В. Афанасьев⁴, Н.Б. Михайлова⁴, В.Б. Ларионова⁵, Е.А. Демина⁵, Н.Г. Тюрина⁶, М.А. Вернюк⁶, Е.Е. Караманешт⁷, А.Г. Румянцев^{1,2}

¹ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³Республиканский центр гематологии и пересадки костного мозга, Минск, Республика Беларусь;

⁴НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ГБОУ ВПО Первый СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России;

⁵ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва;

⁶ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России;

⁷Киевский центр трансплантации костного мозга, Украина

Контакты: Николай Владимирович Жуков zhukov.nikolay@rambler.ru

Аутологичная трансплантация клеток предшественников гемопоэза (ТКПГ) является стандартным методом лечения больных с рецидивами и первично-резистентным течением лимфомы Ходжкина (ЛХ). Согласно существующим рекомендациям, ТКПГ должна выполняться в первом рецидиве или по факту констатации первичной резистентности. Однако мощности отечественных трансплантационных центров недостаточны для проведения ТКПГ в оптимальное время всем имеющим показания больным ЛХ.

Анализ результатов ТКПГ у 369 больных ЛХ, получивших лечение в клиниках РФ и стран СНГ, показал, что проведение до ТКПГ большого объема стандартной химиотерапии (ХТ) является неблагоприятным прогностическим фактором в отношении эффективности мобилизации, сроков восстановления кроветворения и отдаленных результатов ТКПГ. В связи с этим для получения оптимальных результатов ТКПГ должна выполняться не позднее 2-го рецидива заболевания или сразу после констатации первичной резистентности болезни. Результаты лечения пациентов, получивших больший объем терапии до принятия решения о ТКПГ, хуже. Но и они сохраняют шанс на излечение, и должны рассматриваться как потенциальные кандидаты для выполнения ТКПГ при условии получения достаточного количества гемопоэтического материала и достижения ответа на индукционную ХТ.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, рецидив, первично-резистентное течение, высокодозная химиотерапия, аутологичная трансплантация, мобилизация клеток предшественников гемопоэза, выживаемость, летальность

The optimal time for autologous hematopoietic progenitor cell transplantation during treatment of Hodgkin's lymphoma. Foreign recommendations and russian experience

N. V. Zhukov^{1,2}, A. L. Uss³, N. F. Milanovich³, V. V. Ptushkin^{1,2}, B. V. Afanasiev⁴, N. B. Mikhaylova⁴, V. B. Larionova⁵, E. A. Demina⁵, N. G. Tyurina⁶, M. A. Vernyuk⁶, E. E. Karamanesh⁷, A. G. Rumyantsev^{1,2}

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow;

³Republic Center of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Minsk, Belarus;

⁴Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia;

⁵Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

⁶Gertsen Moscow Research Oncology Institute, Ministry of Health of Russia; ⁷Kiev Center of Bone Marrow Transplantation, Ukraine

Autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the standard treatment for patients with relapsed and primary refractory Hodgkin's lymphoma (HL). According to current recommendations HSCT must be performed in first relapse or after registration of primary resistance disease. However, the HSCT in optimal time for all patients with HL who need it is impossible, due to insufficient capacity of national transplant centers.

Analysis of the HSCT results from 369 HL patients treated in Russia and other CIS countries clinics showed that intensive long-term standard chemotherapy prior to transplantation is a poor prognostic factor regarding to mobilization efficacy, hematopoiesis recovery and late HSCT results. In this regard, to achieve best results HSCT must be performed no later than the second relapse or immediately after registration of primary resistance disease. Treatment results in patients received a lot of chemotherapy before transplantation is worse. But they still have a chance for a cure and should be considered as potential candidates to HSCT if obtained sufficient graft quality and hematopoietic response to induction chemotherapy is achieved.

Key words: Hodgkin's lymphoma, relapse, primary refractory disease, high-dose chemotherapy, autologous transplantation, mobilization of hematopoietic progenitor cells, survival, mortality

Введение

Лимфома Ходжкина (ЛХ) является одной из наиболее благоприятных по прогнозу злокачественных опухолей у взрослых: благодаря современным режимам терапии 1-й линии удается добиться излечения более 80 % пациентов [1]. При развитии рецидива или наличии первичной резистентности прогноз менее благоприятен. Однако при условии проведения адекватной терапии и эти пациенты сохраняют шанс на излечение, который достаточно высок. Общая высокая эффективность терапии ЛХ в развитых странах обеспечивается как использованием эффективных программ 1-й линии лечения, так и применением адекватной терапии спасения. Например, в США в 2013 г. было зарегистрировано около 9000 новых случаев ЛХ, а погибло за этот период чуть больше 1000 больных (соотношение умерших и заболевших составило 1:9) [2].

Стандартно рекомендуемым методом лечения больных с рецидивами и первично-резистентным течением ЛХ в большинстве развитых стран мира является высокодозная химиотерапия (ВДХТ) с трансплантацией аутологичных клеток предшественников гемопоэза (ТКПГ). У больных с химиочувствительными рецидивами ЛХ эффективность данного метода лечения была подтверждена в 2 рандомизированных исследованиях. Несмотря на то, что в обоих исследованиях не было показано увеличения общей выживаемости (ОВ), в них было выявлено статистически и клинически значимое преимущество ТКПГ над стандартной терапией 2-й линии в отношении бессобытийной выживаемости (53 % против 10 % [3] и 55 % против 34 % [4]).

Не так однозначно выглядят доказательства эффективности ТКПГ у больных с первично-резистентным течением заболевания и рецидивами ЛХ, не чувствительными к терапии 2-й линии. Однако результаты ряда нерандомизированных исследований свидетельствуют, что ТКПГ позволяет добиться длительной ремиссии у многих таких больных (от 20 до 50 %, по данным различных источников) [5–7]. Принимая во внимание неудовлетворительные результаты использования у этих больных стандартных режимов терапии 2-й линии (долговременная ОВ ~ 10 %, выживаемость, свободная от неудач лечения, ~ 5 %) [8, 9], большинство зарубежных экспертов придерживаются мнения о необходимости попытки выполнения ТКПГ этим больным в случае ответа на индукционную химиотерапию (ХТ).

Оптимальным временем для выполнения ТКПГ в большинстве зарубежных рекомендаций [10–12] и по мнению экспертов [13] считается первая неудача лечения (развитие первого рецидива или констатация первичной резистентности к терапии 1-й линии). По данным регистра Европейской организации по трансплантации костного мозга (ЕВМТ), в странах Евросоюза выполняется около 2500 ТКПГ при ЛХ в год [14]. Однако необходимо признать, что выполнение такого коли-

чества ТКПГ при ЛХ обеспечивается высокой общей трансплантационной активностью в большинстве стран, вошедших в регистр ЕВМТ. По данным за 2011 г., в Италии, например, выполнялось 519 ТКПГ на 10 млн жителей. Даже для достижения среднего показателя по странам, вошедшим в регистр ЕВМТ (151 ТКПГ на 10 млн населения), в РФ необходимо было бы осуществлять более 2100 ТКПГ в год. К сожалению, подобная трансплантационная активность в нашей стране пока недостижима в связи с недостаточным количеством и мощностью имеющихся трансплантационных центров, которых вряд ли хватит даже для того, чтобы провести ТКПГ всем нуждающимся в ней больным ЛХ.

Детальная статистика в РФ отсутствует, однако и существующие цифры позволяют косвенно оценить размер проблемы. Так, в 2009 г. диагноз «лимфома Ходжкина» был впервые установлен у 3149 человек, а погибло 1044 больных ЛХ [15]. Наиболее вероятно, что причиной смерти большинства из них явилась именно ЛХ, не ответившая на терапию 1-й линии, или рецидивы заболевания. Исходя из этого, можно предположить, что суммарная потребность в ТКПГ при ЛХ в РФ составляет около 500 в год с учетом того, что часть пациентов не подлежат ТКПГ в связи с возрастом, тяжелым общим состоянием, абсолютной резистентностью заболевания и т. д. В реальности же за год больным ЛХ выполняется менее 50 ТКПГ [14].

При этом формирование контингента больных ЛХ, получающих ТКПГ, часто идет под влиянием неоднозначных критериев отбора, существующих у онкогематологов общей практики и в трансплантационных центрах. Трансплантационные центры заинтересованы в лечении пациентов с наиболее благоприятным прогнозом: больных, не получавших терапии 2-й линии, с высокой чувствительностью опухоли к индукционной ХТ, больных с рецидивами, но не с первично-резистентным течением заболевания. В связи с этим, пациентам, получавшим в рамках обычных гематологических отделений терапию 2-й линии (и уж тем более не ответившим на нее), больным с первично-резистентным течением ЛХ отказывают в выполнении ТКПГ. С другой стороны, онкогематологи на местах часто относятся к ЛХ как к относительно благоприятному заболеванию даже в случае развития рецидива или отсутствия ответа на ХТ 1-й линии, что приводит к многочисленным попыткам длительного использования стандартной терапии 2-й линии для лечения этой группы больных [16, 17]. Врачи начинают рассматривать ТКПГ как вариант лечения (терапия «последнего шанса») с опозданием.

На первый взгляд, в стране, испытывающей дефицит трансплантационных мощностей, оптимальным является отбор больных с максимальным шансом на достижение длительной ремиссии после ТКПГ. Чем чувствительнее опухоль к предшествующей терапии, чем меньше объем ранее полученного лечения, тем выше ожидаемые результаты ТКПГ. Однако в обоих

исследованиях, послуживших поводом для широкого использования ТКПГ в лечении больных ЛХ, не было показано увеличения ОВ, а в одном из них [4] при медиане наблюдения 39 мес 34 % больных контрольной группы, получивших только терапию 2-й линии, сохраняли достигнутую на ее фоне ремиссию. Таким образом, у части больных, имеющих благоприятный прогноз и ответивших на терапию 2-й линии полной ремиссией, выполнение ТКПГ потенциально может быть отсрочено до развития следующего рецидива.

С другой стороны, проведение множественных курсов ХТ 2-й линии и отсрочка выполнения ТКПГ потенциально может приводить к накоплению органной токсичности и снижать резервы кроветворения, повышая шанс на гибель в раннем посттрансплантационном периоде и/или на длительное восстановление гемопоэза. Предшествующая терапия, не приводящая к излечению, также может привести к увеличению резистентности опухоли на этапе ТКПГ. Не стоит забывать и о риске развития фатальной токсичности агрессивной терапии 2-й линии.

Таким образом, вопрос о том, какие пациенты являются предпочтительными кандидатами для выполнения ТКПГ в условиях дефицита трансплантационных мощностей, остается открытым. Стоит ли в первую очередь трансплантировать пациентов с первым химиочувствительным рецидивом (как максимум — только больных с полной ремиссией заболевания), имеющих наилучшие результаты ТКПГ, но одновременно имеющих и определенный шанс на излечение в результате терапии 2-й линии. Или отдавать предпочтение больным, шансов на излечение при терапии 2-й линии не имеющим, — больные с первично-резистентным течением, больные, не достигшие полной ремиссии после предшествующей терапии 2-й линии или больные со вторым и последующим рецидивом заболевания.

Целью данного исследования является оценка влияния факторов, связанных с объемом ранее проведенного лечения (количество курсов и линий ХТ, лучевой терапии (ЛТ), полученных до проведения ТКПГ), на эффективность и безопасность ТКПГ. Результатом такого анализа может быть разработка соответствующих тактических рекомендаций с учетом имеющихся конкретных национальных возможностей.

Материалы и методы

Критерии отбора

В исследовании проведен анализ клинических данных больных ЛХ, получивших ТКПГ в период с января 1990 по июнь 2013 г. в 5 следующих трансплантационных центрах РФ и стран бывшего СССР: ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; Республиканский центр гематологии и трансплантации костного мозга, Минск, Республика Беларусь; НИИ дет-

ской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация; Киевский центр трансплантации костного мозга, Киев, Украина; ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва, Российская Федерация.

Процедура сбора данных включала обработку первичной медицинской документации (истории болезни), результаты которой заносили в разработанные электронные формы MS Excel. Информацию об этапах лечения, проходивших вне трансплантационных центров, получали из сопроводительной документации (выписки из истории болезни, эпикризы). Информацию о катамнезе больных получали при обследовании пациентов (если пациент оставался под наблюдением учреждения, выполнявшего ТКПГ) или из других источников (паспортные столы, онкологические регистры, учреждения, в которых наблюдается пациент, телефонный контроль).

Определения

Непосредственный эффект проведенного лечения (достижение ремиссии, стабилизации, прогрессирование) оценивали в соответствии с критериями, принятыми в данном центре на момент проведения терапии, и переоценке перед внесением в базу не подвергали.

Первичная резистентность: отсутствие полной или частичной ремиссии после проведения адекватной (на момент проведения лечения) ХТ 1-й линии, либо прогрессирование заболевания в процессе терапии и в течение 3 мес с момента ее окончания.

Рецидив: возврат заболевания после достижения полной или частичной ремиссии в результате проведенной ХТ 1-й линии, возникший в сроки более 3 мес с момента ее окончания: ранний рецидив — рецидив, возникший в течение менее 12 мес после завершения ХТ 1-й линии, поздний — в сроки 12 мес и более. Под множественными рецидивами понимали наличие 2 и более рецидивов заболевания у 1 больного.

Под линией лечения понималось применение нового режима ХТ (или повторное использование ранее применявшегося режима) в связи с изменением клинической ситуации — рецидив, отсутствие ответа на предыдущий режим лечения.

Под терапией 2-й линии понималось химиотерапевтическое лечение, назначенное в связи с неэффективностью ХТ 1-й линии (развитие рецидива или констатация первичной резистентности) как самостоятельный метод противоопухолевого воздействия (не в контексте подготовки к проведению ТКПГ).

Под индукционной ХТ подразумевалось использование одного из режимов 2-й линии с целью циторедукции и оценки химиочувствительности опухоли в целях подготовки к ТКПГ пациентам, у которых уже было принято решение о ее проведении.

Под режимом кондиционирования (ВДХТ) понималось введение больному химиопрепаратов (с или без тотального терапевтического облучения тела) в дозах, требующих последующего выполнения ТКПГ.

Индукционная и высокодозная химиотерапия, трансплантация аутологичных клеток предшественников гемопоэза

Большинству больных перед проведением ТКПГ проводилась индукционная ХТ. Необходимость ее выполнения, режим, критерии оценки ответа на лечение, так же как и показания к ТКПГ и выбор режима кондиционирования, определялись каждой из клиник самостоятельно и не подвергались переоценке в процессе исследования.

В качестве кондиционирования использовали один из нижеперечисленных режимов ВДХТ: ВЕАМ (BCNU, мелфалан, цитарабин, этопозид), СВV (циклофосфамид, BCNU, этопозид), СВV + митоксантрон, ТАСС (CCNU, циклофосфамид, цитарабин, 6-тиогуанин), ВЕТСАМ (BCNU, мелфалан, цитарабин, этопозид, циклофосфамид, тиоТЭФ), тотальное терапевтическое облучение тела + циклофосфамид. После проведения ВДХТ, в сроки, оговоренные стандартным протоколом, специфичным для каждого из режимов, осуществляли ТКПГ, источником которых был костный мозг (КМ), периферическая кровь (ПК) или комбинация клеток предшественников гемопоэза (КПГ) из КМ и ПК.

Сопроводительная терапия

Противоинфекционная, противорвотная, обезболивающая и заместительная терапия проводилась в соответствии со стандартами клиник при проведении ТКПГ и отдельно не оценивалась.

Статистика

ОВ оценивалась как время, прошедшее с момента выполнения ТКПГ до смерти больного от любых причин или до момента последнего наблюдения за больным.

Выживаемость, свободная от неудач лечения, оценивалась как время, прошедшее с момента выполнения ТКПГ до неблагоприятного события (недостижение полной или частичной ремиссии в результате ТКПГ, смерть от любых причин, рецидив) или даты последнего наблюдения за больным.

Для хранения и первичной обработки данных использовали базу данных MS Excel. Статистический анализ проводили при помощи программы SPSS for Windows 13-й версии. Для оценки выживаемости использовался метод Каплана–Майера, кривые сравнивались с использованием log-rank теста. Для анализа непараметрических данных использовали метод χ^2 или точный критерий Фишера (в соответствии с требованиями тестов). Средние и процентные величины указаны со стандартной ошибкой. Статистически

значимыми считались различия при $p < 0,05$ (двусторонний тест).

Результаты

Характеристики больных, включенных в исследование

В исследование было включено 369 пациентов, медиана возраста которых на момент ТКПГ составила 28 (11–57) лет. Все больные страдали ЛХ с неблагоприятным прогнозом, определявшимся как первичная резистентность в 132 (35,8 %) случаях, ранний рецидив в 114 (30,9 %) и поздний рецидив / множественные поздние рецидивы в 123 (33,3 %) случаях. Подробные характеристики больных приведены в табл. 1–5.

Таблица 1. Демографические данные и исходные характеристики заболевания

	Характеристика	Абс. (%)
Пол	Мужчина	180 (48,8)
	Женщина	189 (51,2)
Возраст	< 16	11 (3,0)
	16–39	318 (86,2)
	40–49	32 (8,7)
	> 49	8 (2,1)
Гистологический тип	Лимфоидное истощение	17 (6,4)
	Нодулярный склероз	161 (60,5)
	Смешанно-клеточный	81 (30,5)
	Лимфоидное преобладание	7 (2,6)
	Нет данных	103
Стадия на момент первичного диагноза	I	5 (1,6)
	II	143 (46,9)
	III	91 (29,8)
	IV	66 (21,6)
	Нет данных	64
Наличие В-симптомов на момент первичного диагноза	Отсутствовали	142 (46,6)
	Присутствовали	163 (53,4)
	Не оценены	64

Получение гемопоэтического материала и восстановление кроветворения после трансплантации аутологичных клеток предшественников гемопоэза

В исследование включались пациенты, получившие ТКПГ из различных источников (КМ, КПГ из ПК и комбинированный трансплантат). Однако в настоящее время у подавляющего большинства больных используется ТКПГ из ПК (с или без добавления КМ),

Таблица 2. Лечение, предшествовавшее принятию решения о выполнении ТКПГ, и его результаты

Характеристика	Абс. (%)	
ЛТ в анамнезе	Проводилась	160 (68,4)
	Не проводилась	74 (31,6)
	Нет данных	135
Количество циклов ХТ, полученных до принятия решения о выполнении ТКПГ*	< 10	255 (69,3)
	10–19	100 (27,2)
	> 19	13 (3,5)
	Неизвестно	1
Количество линий ХТ, полученных перед принятием решения о выполнении ТКПГ*	1	200 (57,8)
	2	115 (33,2)
	> 2	31 (9)
	Неизвестно	23
Максимальная длительность ремиссии**	Никогда не достигалась	127 (34,4)
	< 3 мес	5 (1,1)
	3–5,9 мес	20 (5,7)
	6–11,9 мес	94 (25,5)
	12–23,9 мес	64 (17,3)
	24 и более мес	59 (16,0)

Примечание. * – до индукционной ХТ (если проводилась) или непосредственно перед ТКПГ, если индукционная ХТ не проводилась; ** – за весь период заболевания, включая множественные рецидивы.

Таблица 3. Характеристики заболевания перед принятием решения о проведении ТКПГ

Характеристика	Абс. (%)	
Статус болезни	Первичная резистентность	132 (35,8)
	Ранний рецидив	114 (30,9)
	Поздний рецидив (ы)	123 (33,3)
Стадия перед принятием решения о выполнении ТКПГ*	I	8 (2,6)
	II	117 (38,5)
	III	67 (22)
	IV	112 (30,4)
	Нет данных	65
В-симптомы перед принятием решения о выполнении ТКПГ*	Отсутствовали	154 (51,3)
	Присутствовали	146 (48,7)
	Не оценены	65

Примечание. * – перед индукционной терапией (если проводилась) или непосредственно перед ВДХТ (если индукционная терапия не проводилась).

Таблица 4. Индукционная ХТ и ее результаты

Характеристика	Абс. (%)	
Режим индукционной ХТ	Деха-ВЕАМ/mini-ВЕАМ	111 (36,6)
	Платиносодержащие	38 (12,5)
	Деха-ВЕАМ/mini-ВЕАМ + платиносодержащие	119 (39,3)
	Другие режимы	10 (3,3)
	Не проводилась	25 (8,3)
	Нет данных	66
Количество курсов индукционной ХТ	0	25 (8,3)
	1	64 (21,1)
	2	174 (57,4)
	3	22 (7,3)
	> 3	18 (5,9)
	Нет данных	66
Суммарное количество циклов ХТ, полученных до ТКПГ*	< 10	158 (52,1)
	10–19	127 (41,9)
	> 19	18 (5,9)
	Нет данных	66
Статус болезни перед ТКПГ**	Полная ремиссия	42 (13,5)
	Выраженная частичная ремиссия	17 (5,5)
	Частичная ремиссия	175 (56,5)
	Стабилизация	10,2 (12,3)
	Прогрессирование	42 (13,5)
	Нет данных	62

Примечание. * – с учетом курсов индукционной ХТ (если проводилась); ** – после индукционной ХТ (если проводилась) или предшествующей терапии, если ТКПГ осуществлялась без предшествующей индукционной ХТ.

в связи с чем влияние предшествующего лечения на возможность получения гемопоэтического материала и восстановление кроветворения в рамках исследования оценена только у этих пациентов.

Данные о количестве полученных CD34⁺-клеток имелись у 253 больных, включенных в анализ.

Количество циклов стандартной ХТ, проведенных до принятия решения о ТКПГ, оказало статистически значимое влияние на среднее количество полученных CD34⁺-клеток ($p = 0,045$). У 168 больных, получивших до принятия решения о ТКПГ менее 10 циклов стандартной ХТ, в среднем было получено $8,87 \pm 0,62 \times 10^6$ CD34⁺/кг, у 72 больных, получивших от 10 до 19 циклов, $8,36 \pm 1,15 \times 10^6$ CD34⁺/кг, а у 13 больных, получивших 20 и более циклов, – $5,3 \pm 1,1 \times 10^6$ CD34⁺/кг.

Количество циклов ХТ, полученных до принятия решения о выполнении ТКПГ, оказывало влияние

Таблица 5. ВДХТ и ТКПГ

Характеристика		Абс. (%)
Режим кондиционирования	ВЕАМ	336 (91,1)
	СВУ	20 (5,4)
	Другие	13 (3,5)
Источник КПП	КМ	54 (14,6)
	КПП из ПК	283 (76,7)
	Комбинированный трансплантат	32 (8,7)
Трансплантировано CD34 ⁺ × 10 ⁶ /кг	< 2	34 (13,6)
	2–4,9	77 (30,8)
	5–9,9	61 (24,4)
	> 9,9	78 (31,2)
Годы осуществления ТКПГ	1990–1995	31 (8,3)
	1996–2000	95 (25,5)
	2001–2005	88 (23,7)
	2006–2013	158 (42,5)

и на вероятность получения $\geq 2 \times 10^6$ /кг CD34⁺-клеток. Среди больных, которым было проведено менее 10 и от 10 до 19 циклов ХТ, $\geq 2 \times 10^6$ /кг CD34⁺-клеток было получено в 89,1 и 89,3 % случаев соответственно, а у больных, получивших 20 циклов ХТ и более, — лишь в 76,9 % ($p = 0,043$). В отношении возможности получить в результате сбора $\geq 5 \times 10^6$ /кг CD34⁺-клеток влияние количества ранее полученных курсов ХТ оказалось еще более значимым ($p = 0,03$). Вероятность получения требуемого количества клеток составила 60,1; 50,0 и 38,5 % соответственно. Статистически значимого влияния количества линий ранее проведенного лечения, а также выполнения ЛТ в анамнезе на среднее количество полученных CD34⁺-клеток и вероятность получения $\geq 2 \times 10^6$ /кг и $\geq 5 \times 10^6$ /кг CD34⁺-клеток выявлено не было ($p > 0,05$).

Большое количество курсов и линий ранее проведенной ХТ оказывало негативное влияние и на динамику восстановления кроветворения у больных, получивших КПП из ПК или комбинированный трансплантат (табл. 6).

Проведение ЛТ в процессе предшествующего лечения на динамику восстановления кроветворения статистически значимого влияния не оказывало ($p = 0,45$ и $p = 0,19$ для восстановления нейтрофилов и тромбоцитов соответственно).

Количество курсов ХТ, полученных до принятия решения о выполнении ТКПГ, оказало влияние на вероятность длительного восстановления кроветворения (более 21 дня после ТКПГ). Среди больных с известным количеством трансплантированных CD34⁺-клеток, получивших 20 и более циклов ХТ, отсроченное вос-

становление уровня нейтрофилов отмечено в 16,7 % случаев (2 из 12), в то время как при проведении менее 10 циклов, больных с отсроченным восстановлением нейтрофилов было 2,7 % (4 из 149), среди получивших от 10 до 19 циклов — 2,9 % (2 из 69), $p = 0,038$. Количество линий ХТ, полученных до ТКПГ, и факт проведения ЛТ в анамнезе на вероятность отсроченного восстановления уровня нейтрофилов не влияли. На вероятность отсроченного восстановления безопасного уровня тромбоцитов факторы, связанные с объемом ранее проведенного лечения, статистически значимого влияния не оказали.

Непосредственная переносимость трансплантации аутологичных клеток предшественников гемопоэза и ранняя летальность

В течение первых 100 дней с момента выполнения ТКПГ умерли 14 (3,8 %) пациентов, в срок от 100 дней до года после ТКПГ — 17 (4,6 %). Таким образом, в течение года после ТКПГ суммарно умер 31 (8,4 %) больной, включенный в анализ. Основной причиной 100-дневной летальности являлась токсичность лечения, обусловившая смерть 10 из 14 больных, погибших в этот срок. Смерть 9 из 10 пациентов, погибших от токсичности в течение 100 дней после ТКПГ, была обусловлена инфекционно-геморрагическими осложнениями. Одна пациентка погибла от анафилактического шока. Смерть остальных 4 пациентов, погибших в течение 100 дней после ТКПГ, наступила от быстрого прогрессирования ЛХ.

В более поздние сроки (от 100 до 365 дней после ТКПГ) преобладающей причиной смерти пациентов являлось прогрессирование заболевания, от которого погибли 12 из 17 больных. От осложнений проведенного лечения в этот период умерло лишь 5 пациентов. У 4 из них причиной смерти явились инфекционные осложнения, 1 пациентка погибла от лучевого пневмонита.

Таким образом, смерть от токсичности проводимого лечения в течение первого года с момента выполнения ТКПГ была отмечена у 15 (4 %) больных, из них в течение первых 100 дней после ТКПГ у 10 (2,7 %). Непосредственной причиной смерти 13 из 15 больных, погибших в течение первого года после ТКПГ от токсичности проведенного лечения, являлись инфекционно-геморрагические осложнения.

Несмотря на то, что в числовом выражении в отношении 100-дневной летальности отмечалась тенденция к увеличению количества ранних смертей среди пациентов, получивших большой объем предшествующего лечения, различия ни по одному из показателей не достигли статистической значимости. Летальность в интервале между 100 и 365 днями не имела выраженной связи с объемом предшествующего лечения (табл. 7).

При анализе одногодичной летальности также было отмечено большее число ранних смертей среди больных, получивших больший объем ХТ перед принятием

Таблица 6. Влияние лечения, предшествующего ТКПГ, на динамику восстановления кроветворения

Фактор		Медиана времени до восстановления, дни (95 % ДИ)			
		Нейтрофилы > 0,5 × 10 ⁹ /л	p	Тромбоциты > 20 × 10 ⁹ /л	p
Количество циклов ХТ, полученных до ТКПГ	< 10	10 (9,6–10,4)	0,248	10 (9,5–10,5)	0,03
	10–19	10 (9,5–10,5)		10 (9,0–11,0)	
	> 19	10 (7,7–12,3)		13 (11,3–14,7)	
Количество линий ХТ, полученных перед ТКПГ	1	10 (9,6–10,4)	0,049	9 (8,5–9,5)	0,02
	2	10 (9,5–10,5)		10 (7,7–11,6)	
	> 2	11 (10,4–11,6)		11 (10,0–12,0)	

решения о выполнении ТКПГ, однако различия не достигли статистической значимости. Среди пациентов, получивших менее 10 курсов ХТ до принятия решения о проведении ТКПГ, одногодичная летальность составила 8,6 % (22 из 255), среди получивших 10–19 курсов – 7,0 % (7 из 100), у больных, получивших большее количество курсов, – 15,4 % (2 из 13), $p = 0,580$. У больных, получивших 1, 2 и более 2 линий ХТ перед ТКПГ, одногодичная летальность составила 9,5 % (19 из 200), 4,3 % (5 из 115) и 12,9 % (4 из 31), $p = 0,160$. Среди больных, не получивших ранее ЛТ, одногодичная летальность составила 9,5 % (7 из 74), среди получивших – 5,6 % (9 из 160), $p = 0,306$.

Заключение

Проведенное нами исследование показало, что выполнение большого объема лечения перед принятием решения о ТКПГ негативно влияет на эффективность сбора КППГ из ПК. Негативным влиянием на эффективность аферезов обладает количество циклов ХТ, полученных до принятия решения о ТКПГ, но не количество линий или проведение ЛТ в анамнезе. При этом как в отношении среднего количества полу-

ченных CD34⁺-клеток, так и в отношении вероятности получения ≥ 2 и $\geq 5 \times 10^6$ /кг CD34⁺-клеток значимо худшие результаты афереза отмечаются только у больных, получивших ранее ≥ 20 циклов стандартной ХТ. У больных, получивших < 10 и от 10 до 19 циклов ХТ, эти показатели существенно не различаются. Проведение большого количества курсов стандартной ХТ оказывает негативное влияние и на восстановление кроветворения после ТКПГ. У больных, получивших 20 и более циклов ХТ перед принятием решения о ТКПГ, отмечается статистически значимое увеличение среднего времени до восстановления тромбоцитов и значимо больший шанс на отсроченное восстановление уровня нейтрофилов. Стодневная летальность тоже имеет тенденцию к увеличению у больных, получивших 20 и более циклов ХТ, а также у пациентов, получивших более 2 линий лечения, однако различия не достигают статистической значимости (возможно, из-за малого числа больных, получивших ≥ 20 циклов и/или ≥ 2 линий лечения). Таким образом, для обеспечения большей эффективности сбора КППГ из ПК, быстрого восстановления гемопоэза и снижения шансов на гибель в раннем посттрансплантационном пе-

Таблица 7. Влияние предшествующего лечения на раннюю летальность после ТКПГ

Фактор*	Значение (n)	Летальность			
		100-дневная, % (n)	p	> 100–365 дней, % (n)	p
Количество циклов ХТ, полученных до выполнения ТКПГ	< 10 (255)	3,5 (9)	0,733	5,0 (13)	0,612
	10–19 (100)	4,0 (4)		3,3 (3)	
	> 19 (13)	7,7 (1)		7,7 (1)	
Количество линий ХТ, полученных перед выполнением ТКПГ	1 (200)	3,0 (6)	0,609	6,4 (13)	0,07
	2 (115)	3,5 (4)		0,9 (1)	
	> 2 (31)	6,5 (2)		6,5 (2)	
ЛТ в анамнезе	Проводилась (160)	3,1 (3)	0,744	2,5 (4)	0,273
	Не проводилась (74)	4,1 (5)		5,4 (4)	

Примечание. * – несовпадение абсолютного числа больных обусловлено наличием пациентов, у которых было неизвестно наличие одного или нескольких из анализируемых признаков.

рию необходимо ограничение объема стандартной терапии, проводимой до ТКПГ. Анализ влияния пред-

шествующей терапии на отдаленные результаты ТКПГ будет представлен в следующих публикациях.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Franklin J., Diehl V. Current clinical trials for the treatment of advanced-stage Hodgkin's disease: BEACOPP. *Ann Oncol* 2002;13(Suppl. 1):98–101.
- American Cancer Society.: *Cancer Facts and Figures 2013*. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2013. Доступно онлайн: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>.
- Linch D.C., Winfield D., Goldstone A.H. et al. Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: Results of a BNLI randomised trial. *Lancet* 1993;341:1051–4.
- Schmitz N., Pfistner B., Sextro M. et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: A randomised trial. *Lancet* 2002;359:2065–71.
- Sweetenham J.W., Carella A.M., Taghipour G. High-dose therapy and autologous stem cell transplantation for adult patients with Hodgkin's disease who fail to enter remission after induction chemotherapy: results in 175 patients reported to the EBMT. *J Clin Oncol* 1999;17:3101.
- Lazarus H., Rowlings P., Zhang M. et al. Autotransplants for Hodgkin's disease in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 1999;17:534.
- Reece D., Barnett M., Shepherd J. et al. High-dose cyclophosphamide, carmustine (BCNU), and etoposide (VP16-213) with or without cisplatin (CBV +/- P) and autologous transplantation for patients with Hodgkin's disease who fail to enter a complete remission after combination chemotherapy. *Blood* 1995;86:451.
- Longo D., Duffey P., Young R. et al. Conventional-dose salvage combination chemotherapy in patients relapsing with Hodgkin's disease after combination chemotherapy: the low probability for cure. *J Clin Oncol* 1992;10:210.
- Bonfante V., Santoro A., Viviani S. et al. Outcome of patients with Hodgkin's disease failing after primary MOPP-ABVD. *J Clin Oncol* 1997;15:528.
- Hoppe R.T., Advani R.H., Ai W.Z. et al. Hodgkin lymphoma, version 2.2012 featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2012;10(5):589–97.
- Eichenauer D.A., Engert A., Dreyling M.; ESMO Guidelines Working Group. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011;22 Suppl 6: vi55–8.
- Collins G.P., Parker A.N., Pocock C. et al. Guideline on the management of primary resistant and relapsed classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2014;164(1):39–52.
- Kuruvilla J., Keating A., Crump M. How I treat relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2011;117(16):4208–17.
- Passweg J.R., Baldomero H., Bregni M. et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:1161–7.
- Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 г. (Под ред. акад. М.И. Давыдова и д.б.н. Е.М. Аксель). *Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2011;22(3). Приложение 1.
- Филатова Л.В., Тарасенкова А.А., Гершанович М.Л., Семиглазова Т.Ю. Первично-рефрактерные формы лимфомы Ходжкина. *Вопр онкол* 2012;58(5):627–38.
- Богатырева Т., Павлов В., Шкляев С. Рецидивы лимфомы Ходжкина: возможности продления жизни без высокодозной химиотерапии. *Врач* 2012;11:5–8.

Факторы риска реактивации цитомегаловирусной инфекции у детей и подростков после различных видов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

С. Н. Ширяев, Н. В. Станчева, Е. В. Морозова, И. М. Бархатов, М. Ю. Аверьянова, С. В. Разумова, О. В. Голощапов, А. Б. Чухловин, Л. С. Зубаровская, Б. В. Афанасьев

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой
ГБОУ ВПО Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России

Контакты: Сергей Николаевич Ширяев fik9@yandex.ru

Выявлены факторы риска повышения частоты репликации цитомегаловируса (ЦМВ) у детей и подростков с острым лимфобластным и миелобластным лейкозами в раннем периоде после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК): миелоаблативный режим кондиционирования (МАК) – относительный риск (ОР) 3,74 (1,67–8,37), $p = 0,001$; неродственный донор – ОР 2,18 (0,86–5,26), $p = 0,10$; снижение частоты репликации ЦМВ наблюдается при трансплантации от полностью HLA-совместимого донора – ОР 0,24 (0,05–1,06), $p = 0,06$. В позднем периоде после алло-ТГСК наблюдали повышение частоты репликации ЦМВ после МАК – ОР 13,17 (3,00–57,86), $p = 0,001$; снижение частоты репликации ЦМВ при использовании циклоспорина и метотрексата в совокупности с ремиссией лейкоза – ОР 0,13 (0,03–0,50), $p = 0,003$ и костного мозга в качестве источника гемопоэтических стволовых клеток – ОР 0,37 (0,12–1,19), $p = 0,095$. Обнаружена значимая сопряженность острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и репликации ЦМВ – отношение шансов (ОШ) 2,91 (1,07–7,92), $p = 0,006$; увеличение хронической РТПХ при репликации ЦМВ на 3-м месяце после алло-ТГСК ОШ – 2,29 (1,03–5,08), $p = 0,066$; тенденция к снижению риска рецидива лейкоза при репликации ЦМВ – ОР 0,07 (0,004–1,17), $p = 0,06$. Кумулятивная частота ЦМВ-болезни была равна 28 %, смертность от нее составила 44 %.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, цитомегаловирус, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Risk factors of CMV replication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents

S. N. Shiriaev, N. V. Stancheva, Ye. V. Morozova, I. M. Barkhatov, M. Yu. Averianova, S. V. Razumova, O. V. Goloshchapov, A. B. Chukhlovina, L. S. Zubarovskaya, B. V. Afanasiev

Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation,
I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia

Risk factors of CMV replication in early period after allo-HSCT (D0-D100) were – myeloablative conditioning – HR 3.74 (1.67–8.37), $p = 0.001$; unrelated donor – HR 2.18 (0.86–5.26), $p = 0.10$; HLA-matched donor – HR 0.24 (0.05–1.06), $p = 0.06$. In late posttransplant period (from D+100) significant risk factors of CMV-reactivation were (according to multivariate analysis) myeloablative conditioning – HR 13.17 (3.00–57.86), $p = 0.001$; combination of pretransplant remission of leukemia and using cyclosporine and methotrexate – HR 0.13 (0.03–0.50), $p = 0.003$; combination of aGVHD and CMV reactivation in early posttransplant period – HR 2.71 (0.86–8.50), $p = 0.088$; using of bone marrow – HR 0.37 (0.12–1.19), $p = 0.095$. We revealed the significant association of aGVHD and CMV-reactivation – OR 2.91 (1.07–7.92), $p = 0.006$, and increased rate of cGVHD in patients with CMV replication at third month after allo-HSCT OR – 2.29 (1.03–5.08), $p = 0.066$. We revealed a tend to decreasing relapse risk in patients who had CMV-replication – HR 0.07 (0.004–1.17), $p = 0.06$. Cumulative incidence of CMV-disease was 28 %. CMV-disease was lethal in 44 % patients.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, acute myeloblastic leukemia, cytomegalovirus, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Введение

Несмотря на существенные успехи детской онкологии и гематологии в создании и усовершенствовании программ полихимиотерапии, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) продолжает оставаться наиболее эффективным методом лечения тяжелых в прогностическом отношении злокачественных заболеваний системы крови: рецидивов, резистентных форм и неблагоприятных вариантов острых лейкозов [1–6].

Однако широкое применение алло-ТГСК ограничивает значительное количество осложнений, возника-

ющих в раннем и позднем периодах после алло-ТГСК, в том числе приводящих к повышенной летальности.

Одним из значимых осложнений алло-ТГСК является цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция. Частота реактивации ЦМВ-инфекции после алло-ТГСК составляет 60–70 % [7, 8]. Несмотря на значительное количество исследований ЦМВ-инфекции после алло-ТГСК, ряд вопросов, в том числе касающихся факторов риска и влияния ЦМВ-инфекции на течение и исход после алло-ТГСК, остаются неопределенными.

В литературе отсутствует однозначное мнение о влиянии режима кондиционирования на кумулятивную

частоту реактивации ЦМВ. Несмотря на более раннее иммунное восстановление Т-опосредованного митогенного ответа после алло-ТГСК с редуцированной интенсивностью кондиционирования (РИК) [9], только в одном исследовании показано уменьшение частоты реактивации ЦМВ после алло-ТГСК с немиелоаблативными режимами кондиционирования [10], по данным же ряда других исследований [10–16], наблюдалось либо увеличение частоты репликации ЦМВ после алло-ТГСК с РИК, либо отсутствие достоверного влияния интенсивности режима кондиционирования на частоту репликации ЦМВ-инфекции.

Многочисленными исследованиями показано увеличение риска реактивации ЦМВ при наличии острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [12, 17–19]. Только в одной работе выявлено увеличение риска острой РТПХ у пациентов с предшествующей реактивацией ЦМВ: относительный риск (ОР) 2,18; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,30–3,65; $p < 0,01$ [19].

По данным некоторых исследований, обнаруживается уменьшение риска рецидива основного заболевания при наличии репликации ЦМВ после алло-ТГСК [19, 20], по другим данным, подобного влияния репликации ЦМВ обнаружено не было [21].

Цель исследования — изучить факторы, способствующие реактивации ЦМВ-инфекции у детей и подростков в раннем и позднем периодах в зависимости от особенностей проведения алло-ТГСК, а также влияние ЦМВ-реактивации на отдаленные результаты данного метода лечения.

Пациенты и методы

В исследование было включено 58 больных в возрасте от 1,5 до 21 года (медиана возраста — 10 лет), 35 мальчиков и 23 девочки, страдающих острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), — 33 (57 %) пациента и острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) — 25 (43 %) пациентов. У 39 (67 %) пациентов алло-ТГСК была выполнена в ремиссии заболевания (1, 2 и 3-я ремиссии), у 19 (33 %) пациентов алло-ТГСК проведена вне ремиссии заболевания (рецидив/резистентность). Характеристика пациентов и выполненных алло-ТГСК представлена в табл. 1.

У исследуемых пациентов не использовалась специфическая профилактика ЦМВ-инфекции. С целью профилактики реактивации вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов применяли ацикловир в дозе 5 мг/кг 3 раза в сутки с момента приживления ГСК донора.

В соответствии с рекомендациями ESI [20] для мониторинга ЦМВ-ДНКемии применяли количественную полимеразно-цепную реакцию (ПЦР). В качестве субстрата исследования использовалась плазма крови.

Исследование выполняли до начала режима кондиционирования перед алло-ТГСК и далее еженедельно с дня +1 (Д + 1) до дня +100 (Д+100). При выявле-

Таблица 1. Характеристика пациентов

Переменные	N (%)
Общее число	58
Возраст, лет (медиана)	10 (1,5–21)
Пол, муж/жен	35/23
Диагноз	
ОЛЛ	33 (57)
ОМЛ	25 (43)
ремиссия (1, 2, 3-я)	39 (67)
рецидив/резистентность	19 (33)
Источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК)	
костный мозг (КМ)	38 (65)
периферические стволовые клетки крови (ПСКК)	20 (35)
Тип донора	
неродственный	38 (65)
родственный	20 (35)
Совместимость по HLA-антигенам	
HLA-совместимость	52 (90)
частичная HLA-несовместимость	6 (10)
Совместимость реципиента и донора по полу	
совместимость по полу	36 (62)
несовместимость по полу	22 (38)
Режим кондиционирования	
Миелоаблативный (МАК)	33 (57)
бусульфан 16 мг/кг + циклофосфан 120 мг/кг	28 (85)
треосульфат 36 г/м ² + циклофосфан 120 мг/кг	1 (3)
другие	4 (12)
Немиелоаблативный	25 (43)
бусульфан 8 мг/кг + флударабин 150 мг/м ²	18 (72)
мелфалан 140 мг/м ² + флударабин 150 мг/м ²	2 (8)
флударабин 150 мг/м ² + цитозар 12 г/м ²	2 (8)
флударабин 200 мг/м ² + тиотепа 10 мг/кг + мелфалан 120 мг/м ²	3 (16)
Применение антилимфоцитарных антител (АТГ/алемтузумаб)	
АТГ/алемтузумаб +	40/1 (71)
АТГ/алемтузумаб –	17 (29)
Профилактика острой РТПХ	
CsA + MTX	29 (50)
CsA + MMF	4 (7)
Tx + MMF	17 (29)
Tx + MTX	4 (7)
Tx + Cy	1 (2)
CsA + антиCD20/антиCD52/стероиды	3 (5)
ЦМВ-серостатус реципиента (Р) и донора (Д)	
Р–/Д–	5 (9)
Р–/Д+	3 (5)
Р+/Д–	17 (29)
Р+/Д+	33 (57)

нии ЦМВ-ДНКемии в раннем периоде после алло-ТГСК исследование продолжалось после Д + 100 до получения негативного результата.

Анализ других биологических жидкостей – ликвор, лаважная жидкость – проводился при наличии симптомов поражения центральной нервной системы и легких соответственно.

Диагностическим значением репликации ЦМВ-инфекции считали обнаружение 1000 копий/мл или более этого уровня. При ЦМВ-ДНКемии от 1000 копий/мл и выше назначалась превентивная противовирусная терапия: ганцикловир в дозе 5 мг/кг/сут. При увеличении вирусной нагрузки на 1 lg и более доза ганцикловира увеличивалась до 10 мг/кг/сут (5 мг/кг 2 раза в сутки).

Для диагностики ЦМВ-болезни использовались критерии ЕСП-4 [20]. ЦМВ-пневмония диагностировалась при сочетании клинических и рентгенологических признаков пневмонии, обнаружении ЦМВ в бронхоальвеолярно-лаважной жидкости посредством качественной/количественной ПЦР.

ЦМВ-колит диагностировали при сочетании клинических, эндоскопических признаков поражения толстой кишки (отек, эритематозные изменения, эрозии, изъязвления слизистой, наличие экссудата в просвете кишечника) и обнаружении ЦМВ в биоптате слизистой толстой кишки посредством качественной ПЦР.

ЦМВ-энцефалит диагностировали при сочетании клинических, рентгенологических признаков поражения головного мозга и обнаружении ЦМВ в ликворе посредством качественной/количественной ПЦР.

Для анализа полученных данных использовали методы статистики согласно общепринятым правилам и международным рекомендациям. Факторы, имеющие статистическую достоверность $p < 0,2$ в унивариантном анализе, включались в многофакторную регрессионную модель. Обработка результатов проводилась с использованием стандартного пакета статистических программ Excel® 10.0, SPSS 19, Easy R.

Результаты

Факторы риска репликации цитомегаловирусной инфекции

Частота первичной ЦМВ-инфекции/реактивации составила 74 % с медианой реактивации 36 дней.

Произведено исследование пре- и посттрансплантационных факторов риска реактивации ЦМВ-инфекции в течение раннего и позднего периодов после алло-ТГСК.

В многофакторном анализе (регрессия Кокса) было выявлено достоверное увеличение риска ДНКемии от 1000 копий/мл в раннем периоде (до Д + 100) после алло-ТГСК с МАК ($p = 0,001$), тенденция к увеличению риска ДНКемии при частичной HLA-совместимости реципиента и донора ($p = 0,059$), тенденция к увеличению риска ДНКемии при использовании неродственного донора ($p = 0,102$).

При исследовании факторов риска реактивации ЦМВ в позднем периоде в разведывательном анализе обнаружено достоверное влияние 2 взаимосвязанных факторов – стадии заболевания и профилактики острой РТПХ. Данные факторы были включены в модель пропорциональных рисков Кокса в качестве произведения. По данным многофакторного анализа было обнаружено достоверное увеличение риска ЦМВ-ДНКемии от 1000 копий/мл в позднем периоде после алло-ТГСК с МАК ($p = 0,001$), снижение риска при выполнении алло-ТГСК в ремиссии основного заболевания в сопряженности с использованием циклоsporина и метотрексата в качестве профилактики острой РТПХ ($p = 0,003$), тенденция к уменьшению риска ЦМВ-ДНКемии при использовании КМ в качестве источника ГСК ($p = 0,095$).

Таким образом, частота реактивации ЦМВ-инфекции была выше после МАК в сравнении с РИК вне зависимости от периода после алло-ТГСК, а также при проведении трансплантации в рецидиве заболевания (сопряжено с использованием такролимуса и микофенолата мофетила) (табл. 2).

Таблица 2. Факторы, увеличивающие вероятность репликации ЦМВ (ДНКемии от 1000 копий/мл) в раннем и позднем периодах после алло-ТГСК. Многофакторный анализ (регрессия Кокса)

Фактор		ОР	95,0 % ДИ	p
Факторы риска репликации ЦМВ в раннем периоде после алло-ТГСК				
Режим кондиционирования	МАК	3,74	1,67–8,37	0,001
	Со сниженной интенсивностью доз	1		
Совместимость по HLA-антигенам	Полная HLA-совместимость	0,24	0,05–1,06	0,059
	Частичная HLA-совместимость	1		
Тип донора	Неродственный	2,13	0,86–5,26	0,102
	Родственный	1		
Факторы риска репликации ЦМВ в позднем периоде после алло-ТГСК				
Режим кондиционирования	МАК	13,17	2,99–57,86	0,001
	Со сниженной интенсивностью доз	1		
Источник ГСК	КМ	0,37	0,12–1,19	0,095
	ПССК	1		
Стадия заболевания* профилактика острой РТПХ	Ремиссия* Цс*метотрексат	0,13	0,03–0,50	0,003
	Рецидив* Тх*микофенолата мофетил	1		

Примечание. * – произведение факторов риска (факторы были статистически значимо сопряжены у исследуемых пациентов). Цс – циклоспорин; Тх – такролимус.

Репликация цитомегаловирусной инфекции и острая реакция «трансплантат против хозяина»

У реципиентов алло-ТГСК было исследовано влияние острой РТПХ на течение ЦМВ-инфекции. Была

обнаружена сопряженность острой РТПХ II–IV степени и репликации ЦМВ (ЦМВ-ДНКемии). Отмечалось достоверно значимая сопряженность ЦМВ-ДНКемии от 1000 копий/мл и острой РТПХ: отношение шансов (ОШ) 2,91; 95 % ДИ 1,07–7,92; $p = 0,006$, в отличие от ЦМВ-ДНКемии от 500 копий/мл ОШ 1,92; 95 % ДИ 0,60–6,11; $p = 0,20$.

Однако при сравнении медиан дебюта острой РТПХ и повышения ЦМВ-вирусной нагрузки от 1000 копий/мл и выше различий обнаружено не было: медианы равнялись 28 дням и 27 дням соответственно, $p = 0,99$ (рис. 1).

Учитывая факт наличия сопряженности между ЦМВ-ДНКемией более 1000 копий/мл и острой РТПХ II–IV степени, было исследовано влияние острой РТПХ на риск ЦМВ-ДНКемии от 1000 копий/мл и влияние высокой ЦМВ-вирусной нагрузки на риск острой РТПХ.

Для оценки влияния острой РТПХ на риск реактивации ЦМВ риск ЦМВ-ДНКемии ≥ 1000 копий/мл был сравнен у пациентов с острой РТПХ и без нее. В однофакторном анализе отмечалась тенденция к увеличению риска реактивации ЦМВ при наличии острой РТПХ: 91 % и 50 % соответственно, $p = 0,074$ (рис. 2).

В многофакторном анализе достоверного влияния острой РТПХ на риск реактивации ЦМВ от 1000 копий/мл не было обнаружено ($p = 0,166$).

Для изучения влияния активной ЦМВ-инфекции на частоту острой РТПХ было проведено сравнение риска развития острой РТПХ у пациентов с ЦМВ-ДНКемией от 1000 копий/мл и без ЦМВ-ДНКемии от 1000 копий/мл. В результате исследования не получено данных о достоверном увеличении риска острой РТПХ при наличии и отсутствии предшествующей ЦМВ-ДНКемии от 1000 копий/мл: 47 % и 25 % соответственно, $p = 0,33$ (рис. 3).

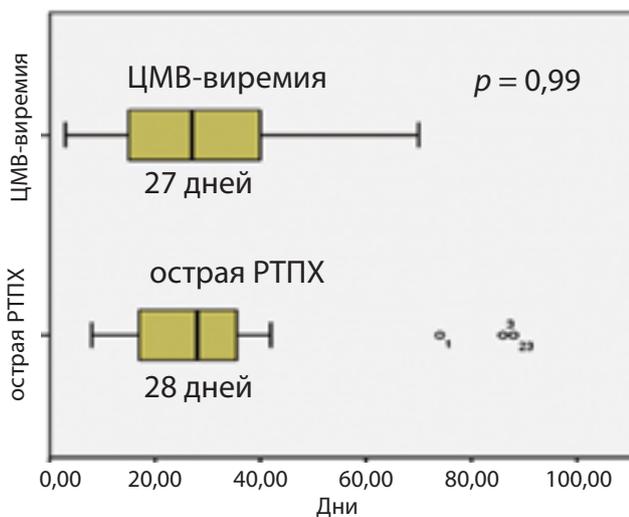


Рис. 1. Сроки повышения ЦМВ-ДНКемии до 1000 копий/мл и развитие острой РТПХ после алло-ТГСК (дни), U-критерий Манна–Уитни

Репликация цитомегаловирусной инфекции и хроническая реакция «трансплантат против хозяина»

У пациентов с острой РТПХ реактивация ЦМВ от 1000 копий/мл в течение всего раннего периода после алло-ТГСК статистически незначимо увеличивала частоту хронической РТПХ: ОШ 1,67; 95 % ДИ 0,41–6,77; $p = 0,37$.

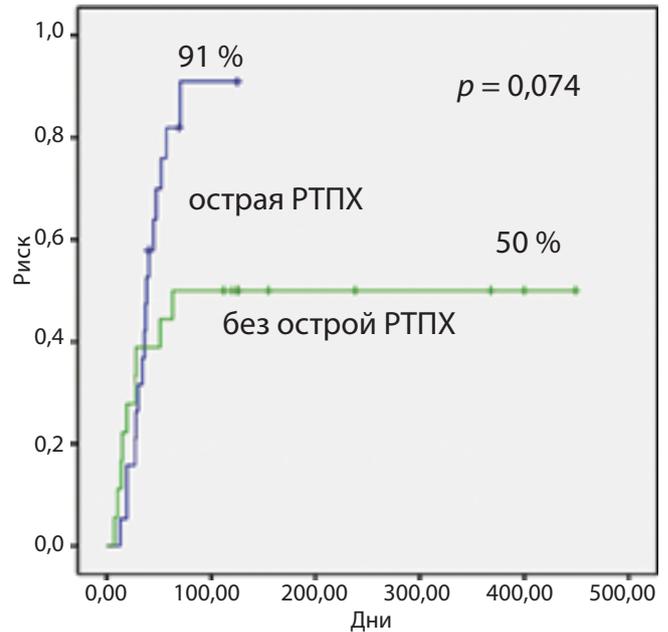


Рис. 2. Риск ЦМВ-ДНКемии ≥ 1000 копий/мл у пациентов с наличием и отсутствием острой РТПХ, метод Каплана–Мейера: синяя линия – острая РТПХ (+), зеленая линия – острая РТПХ (-)

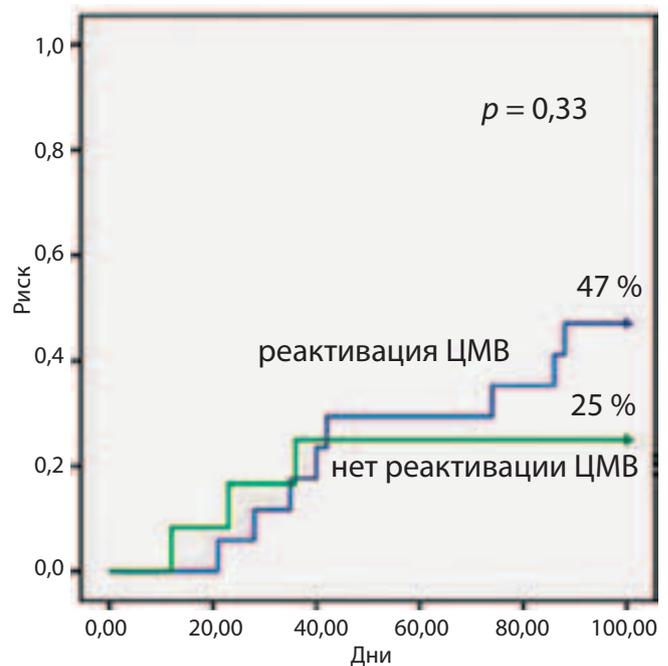


Рис. 3. Риск острой РТПХ у пациентов с наличием и отсутствием предшествующей ЦМВ-ДНКемии от 1000 копий/мл, метод Каплана–Мейера: синяя линия – репликация ЦМВ (+); зеленая линия – репликация ЦМВ (-)

Для исследования влияния репликации ЦМВ на частоту хронической РТПХ было проведено исследование влияния ЦМВ-ДНКемии на 3-м месяце после алло-ТГСК (ввиду отсутствия сопряженности с частотой острой РТПХ) на частоту хронической РТПХ.

Наблюдалось увеличение частоты хронической РТПХ у пациентов с ЦМВ-ДНКемией от 1000 копий/мл на 3-м месяце после алло-ТГСК: ОШ 2,29; 95 % ДИ 1,03–5,08; $p = 0,066$.

В дополнение к этому, на 3-м месяце посттрансплантационного периода в подгруппах пациентов с наличием и отсутствием острой РТПХ обнаружено провоцирующее влияние репликации ЦМВ на частоту хронической РТПХ, без статистической значимости ($p = 0,12$).

Хроническая реакция «трансплантат против хозяина» и репликация цитомегаловирусной инфекции в позднем посттрансплантационном периоде

При анализе влияния репликации ЦМВ-инфекции в позднем периоде (более $D + 100$) после алло-ТГСК сопряженности активной ЦМВ-инфекции и хронической РТПХ не было выявлено ($p = 0,73$).

Суммарные данные о факторах, влияющих на реактивацию ЦМВ-инфекции после алло-ТГСК, см. в табл. 2.

Частота развития цитомегаловирусного заболевания

ЦМВ-заболевание было диагностировано у 10 из 58 пациентов, кумулятивная частота развития ЦМВ-заболевания составила 28 % (рис. 4).

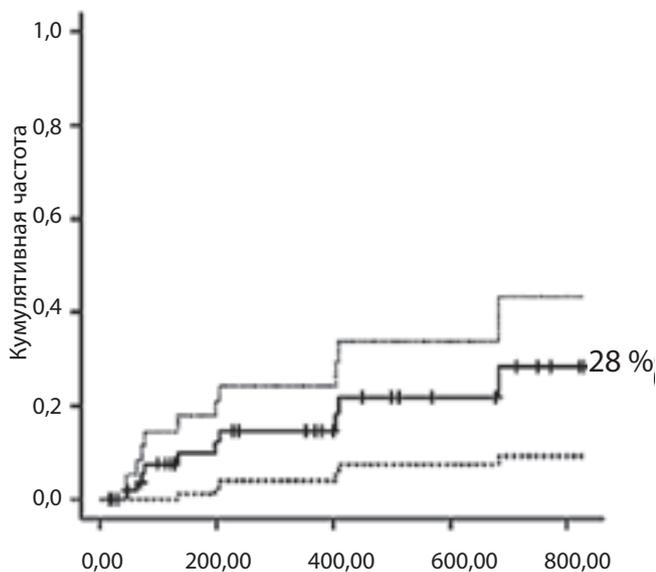


Рис. 4. Кумулятивная частота ЦМВ-заболевания после алло-ТГСК у детей и подростков с острыми лейкозами: сплошная черная линия — кумулятивная частота ЦМВ-заболевания, прерывистая и серая линии — 95 % ДИ

В 50 % случаев ЦМВ-заболевание было диагностировано к $D + 77$, наиболее раннее проявление ЦМВ-болезни отмечено на $D + 28$, наиболее позднее к $D + 178$, около 75 % случаев ЦМВ-болезни были диагностированы до $D + 100$.

При этом не было показано различия частоты ЦМВ-заболевания в зависимости от комбинаций по ЦМВ-статусу донора и реципиента до алло-ТГСК: так, не отмечалось достоверного увеличения частоты ЦМВ-болезни у ЦМВ-серопозитивных реципиентов после алло-ТГСК от ЦМВ-серонегативного донора — ОР 2,1; 95 % ДИ 0,71–4,93; $p = 0,22$ — в сравнении с частотой ЦМВ-заболевания у ЦМВ-серопозитивных реципиентов после алло-ТГСК от ЦМВ-серопозитивного донора.

В подавляющем большинстве случаев ЦМВ-заболевание было представлено ЦМВ-пневмонией — 8 (80 %) пациентов. В единичных случаях наблюдали развитие энцефалита (1 (10 %) больной) и колита (1 (10 %) больной).

Отмечалось увеличение частоты бактериальных инфекций у пациентов с ЦМВ-заболеванием в сравнении с пациентами без ЦМВ-заболевания — 90 % и 64,5 % соответственно ($p = 0,15$), а также повышение частоты инвазивных микозов у пациентов с ЦМВ-заболеванием в сравнении с пациентами без ЦМВ-заболевания — 60 % и 34,5 % соответственно ($p = 0,17$).

Летальность при развитии ЦМВ-заболевания составила 44 % (все фатальные случаи ЦМВ-заболевания — ЦМВ-пневмония), однако значимого влияния ЦМВ-заболевания на исход алло-ТГСК в общей группе пациентов не было установлено. Так, по данным регрессии Кокса (однофакторный анализ) наблюдалось следующее влияние ЦМВ-заболевания на исход алло-ТГСК: общая выживаемость — ОР 1,36; 95 % ДИ 0,54–3,41; $p = 0,5$; бессобытийная выживаемость — ОР 1,03; 95 % ДИ 0,45–2,35; $p = 0,94$; риск рецидивов — ОР 0,85; 95 % ДИ 0,25–2,91; $p = 0,79$; риск трансплантационной летальности — ОР 1,09; 95 % ДИ 0,31–3,86; $p = 0,90$.

Влияние репликации цитомегаловирусной инфекции на исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

При анализе влияния ЦМВ-ДНКемии в раннем периоде на исход алло-ТГСК не было выявлено значимого влияния на общую выживаемость — ОР 1,11; 95 % ДИ 0,41–3,04; $p = 0,83$; бессобытийную выживаемость — ОР 0,6; 95 % ДИ 0,29–1,23; $p = 0,16$; кумулятивную частоту рецидивов — ОР 0,49; 95 % ДИ 0,18–1,29; $p = 0,15$; кумулятивную частоту трансплантационной летальности — ОР 1,13; 95 % ДИ 0,31–4,14; $p = 0,85$.

Также не было обнаружено достоверного влияния репликации ЦМВ-инфекции в позднем периоде после алло-ТГСК на исход алло-ТГСК: общую выживаемость — ОР 2,45; 95 % ДИ 0,63–9,53; $p = 0,20$; бессобытийную выживаемость — ОР 2,15; 95 % ДИ 0,64–

7,18; $p = 0,21$; кумулятивную частоту рецидивов – ОР 2,88; 95 % ДИ 0,56–14,99; $p = 0,21$; кумулятивную частоту трансплантационной летальности – ОР 1,46; 95 % ДИ 0,24–8,77; $p = 0,68$.

Тем не менее было обнаружено некоторое влияние активной ЦМВ-инфекции с высокой вирусной нагрузкой от 1000 копий/мл на частоту рецидивов основного заболевания в сопряженности с группой пациентов с острой РТПХ, у которых была обнаружена тенденция к уменьшению риска рецидива лейкоза при реактивации ЦМВ ($p = 0,06$).

Обсуждение

По нашим данным, частота реактивации / первичной ЦМВ-инфекции (ЦМВ-ДНКемия от 1000 копий/мл) составила 74 %, что несколько выше частоты реактивации / первичной ЦМВ-инфекции по данным других исследователей [10, 22, 23]. Возможно, это обусловлено более высокой частотой ЦМВ-инфицированности реципиентов и доноров в нашем исследовании.

В результате исследования было обнаружено достоверное и независимое увеличение кумулятивной частоты ЦМВ-инфекции как в раннем, так и в позднем периодах после алло-ТГСК с МАК в сравнении с использованием режимов кондиционирования с редуцированной интенсивностью. Эти данные противоположны результатам, полученным в некоторых исследованиях, показывающих увеличение частоты реактивации ЦМВ / первичной ЦМВ-инфекции после алло-ТГСК с РИК [12–14]. Увеличение частоты реактивации ЦМВ / первичной ЦМВ-инфекции после алло-ТГСК с РИК может быть обусловлено неравнозначностью пациентов в группах, получивших РИК и МАК, – более старший возраст, предпочтенность пациентов, получивших РИК [19], малым количеством наблюдений [13–15, 18], использованием алектузумаба в обеих подгруппах [10, 13]. Увеличение кумулятивной частоты ЦМВ-инфекции после алло-ТГСК с МАК, обнаруженное в нашем исследовании, может быть обусловлено «цитокиновым штормом» – более выраженным после интенсивного режима кондиционирования и являющимся известным триггером реактивации ЦМВ [24, 25].

В ходе исследования было обнаружено достоверное увеличение кумулятивной частоты ЦМВ при использовании такролимуса и микофенолата мофетила в качестве профилактики острой РТПХ в сравнении с использованием циклоспорина и метотрексата, что согласуется с другими исследованиями, обнаруживающими повышенный риск репликации ЦМВ при использовании микофенолата мофетила [26], такролимуса [8]. Однако провоцирующее влияние такролимуса и микофенолата мофетила не было подтверждено другими исследованиями [12, 27].

Обнаружена тенденция к увеличению кумулятивной частоты ЦМВ-репликации после алло-ТГСК от частично HLA-совместимого донора в сравнении с ис-

пользованием полностью HLA-совместимого донора. Увеличение кумулятивной частоты ЦМВ-репликации после алло-ТГСК от неродственного донора в сравнении с использованием сиблинга было установлено ранее [12, 28, 29], что, наиболее вероятно, обусловлено более длительной иммунной реконституцией, в том числе восстановлением специфического анти-ЦМВ клеточного иммунитета [2]. В дополнение к этому наблюдали некоторое увеличение частоты бактериальных и грибковых инфекций у пациентов с репликацией ЦМВ.

Полученные данные об увеличении риска реактивации ЦМВ у пациентов с предшествующей острой РТПХ и значимой сопряженности острой РТПХ и реактивации ЦМВ согласуются с большинством данных [12, 17, 18], что связано с применением иммуносупрессантов при лечении острой РТПХ, а также с провоцирующим влиянием цитокинов, секретируемых эффекторными клетками при острой РТПХ, липополисахаридами, проникающими в системный кровоток кишечника при острой РТПХ и собственно аллогенной стимуляцией донорских Т-клеток, являющейся триггером репликации ЦМВ [24].

В нашем исследовании обнаружена тенденция к уменьшению риска первичной ЦМВ-инфекции / реактивации ЦМВ в позднем периоде после алло-ТГСК при использовании КМ в качестве источника ГСК в сравнении с ПСКК. Учитывая результаты исследования Т. Zhuravskaia et al. [28], показавшие возможность латентной инфекции в CD34⁺-клетках, обнаруженная тенденция может быть объяснена увеличением ЦМВ-инфицирующей дозы при использовании ПСКК. Однако в исследовании, проведенном Р. Ljungman et al. [30], не было обнаружено достоверного влияния источника ГСК на риск реактивации ЦМВ в раннем и позднем периодах после алло-ТГСК.

Частота ЦМВ-болезни была равна 28 %. Большинство исследований частоты ЦМВ-болезни выполнено на взрослой популяции больных. Так, в исследовании Р. Ljungman et al. [30] при использовании РИК и МАК 100-дневная кумулятивная встречаемость ЦМВ-болезни составила 1,8 %, одногодичная – 6,3 %, медиана развития ЦМВ-болезни – 104 дня (95 % ДИ 39–200). У реципиентов алло-ТГСК с РИК-режимами кондиционирования 2-летняя кумулятивная встречаемость ЦМВ-болезни с медианой развития 92 дня (95 % ДИ 26–465) составила 11 % [31]. Высокая частота ЦМВ-болезни в исследовании, вероятно, обусловлена значительной долей пациентов, имевших рецидив заболевания в момент проведения алло-ТГСК. Смертность при ЦМВ-заболевании в нашем исследовании соответствует данным других исследований [32].

Обнаруженное повышение частоты других инфекционных осложнений у пациентов с ЦМВ-заболеванием согласуется с данными других авторов [33, 34].

Нами было выявлено увеличение частоты хронической РТПХ у пациентов с реактивацией ЦМВ на 3-м месяце после алло-ТГСК. К. Larsson et al. [35] косвенно

показали провоцирующее влияние ЦМВ-инфекции на частоту хронической РТПХ: снижение частоты хронической РТПХ у пациентов, получавших превентивную терапию ЦМВ-инфекции.

В нашем исследовании, а также по данным других авторов [10, 20], показана тенденция к снижению риска рецидива лейкоза у пациентов с реактивацией ЦМВ в раннем периоде после алло-ТГСК.

Механизм, лежащий в основе сопряженности реактивации ЦМВ-инфекции и снижения риска рецидива, доподлинно не известен. Часть предположений о влиянии ЦМВ-инфекции на риск рецидива основывается на данных обнаружения в большом титре генома ЦМВ в миелоблестах при ОМЛ. Возможно, что снижение риска рецидива у пациентов с ЦМВ-инфекцией связано с лизисом инфицированных ОМЛ-бластов иммунокомпетентными клетками донора. Такое предположение подтверждается работами J.M. Fletcher et al. [36], показавшими, что ЦМВ-инфекция изменяет экспрессию антигена LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen-3), выраженность изменений экспрессии которого коррелирует с активностью лизиса ЦМВ-инфицированных клеток НК-клетками [36]. Возможно также, что ЦМВ-инфекция, протекающая в ОМЛ-миелоблестах, приводит к повышению экспрессии антигенов малой гистосовместимости и/или лейкозассоциированных антигенов, что делает эти клетки более доступными для лизиса донорскими цитотоксическими клетками.

Некоторыми исследователями также показана ассоциация ЦМВ-инфекции и снижения риска рецидивов при других заболеваниях, в том числе при ОЛЛ [24].

В исследовании D. Nachbaur et al. [15] было выявлено улучшение безрецидивной выживаемости после совместимых родственных алло-ТГСК с режимами кондиционирования со сниженной интенсивностью доз у ЦМВ-серопозитивных реципиентов. Исходя из наблюдения, что снижение риска рецидива было особенно значимо в подгруппе HLA A2 пар реципиент/донор, авторы предположили, что имеется перекрестная активность ЦМВ-специфичных HLA A2-ограниченных CD8⁺-клеток к антигенам малой гистосовместимости или лейкозассоциированным антигенам, что и проявляется антилейкозной активностью CD8⁺-клеток ЦМВ-серопозитивных донора и/или реципиента [37]. Однако последующие исследования, в том числе выполненные V. Erard et al. [37], не подтвердили данное предположение.

Выводы

Таким образом, анализ выявленных факторов риска и состояний, сопряженных с реактивацией ЦМВ-инфекции, позволит проводить индивидуализированную профилактику и превентивную терапию ЦМВ-инфекции в зависимости от выявленных факторов риска и возникающих на этом фоне осложнений у реципиентов после различных видов алло-ТГСК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С., Семенова Е.В. и др. Опыт применения неродственной аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток в клинике трансплантации костного мозга СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Тер архив 2007;7:36–43.
2. Афанасьев Б.В., Вавилов В.Н., Цандер А.Р. Восстановление лимфоцитов периферической крови у пациентов с гематологическими заболеваниями после аллогенной неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Тер архив 2007;7:44–7.
3. Семенова Е.В., Станчева Н.В., Паина О.В. и др. Трансплантация костного мозга при остром лимфобластном лейкозе у детей. Сб. мат. I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток». Минск: Профессиональные издания, 2013. С. 159–161.
4. Бондаренко С.Н., Семенова Е.В., Вавилов В.Н. и др. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при остром миелобластном лейкозе в первой ремиссии. Тер архив 2013;7:18–25.
5. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. М.: Медицинское информационное агентство, 2003. 443 с.
6. Слесарчук О.А., Бабенко Е.В., Семенова Е.В. и др. Эффективность инфузии донорских лимфоцитов у пациентов после различных видов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Тер архив 2013;85(7):26–33.
7. Балашов Д.Н., Трахтман П.Е., Скоробогатова Е.В. и др. Факторы риска цитомегаловирусной инфекции у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Онкогематол 2010;4:20–6.
8. Nakamae H., Katharine A.K., Sandmaier B.M. et al. Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2009;15(6):694–703.
9. Morecki S., Gelfand Y., Nagler A. et al. Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen. Bone Marrow Transplant 2001;28(3):243–9.
10. Perez-Simon J.A., Kottaridis P.D., Martino R. et al. Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. Blood 2002;100:3121–7.
11. Oh S.J., Lee K.H., Lee J.H. et al. The risk of cytomegalovirus infection in nonmyeloablative peripheral stem cell transplantation compared with conventional bone marrow transplantation. J Korean Med Sci 2004;19:172–6.
12. Mohty M., Mohty A.M., Blaise D. et al. Cytomegalovirus-specific immune recovery following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with reduced-intensity preparative regimen. Bone Marrow Transplant 2004;33:839–46.
13. Kalpoe J.S., van der Heiden P.L., Vaessen N. et al. Comparable incidence and severity of cytomegalovirus infections following T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation preceded by reduced intensity or myeloablative

- conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:137–43.
14. Hill Q.A., Hill A., Collyns T.A. et al. Similar lymphocyte recovery and CMV reactivation profiles between reduced intensity conditioning with alemtuzumab and myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:749–51.
15. Nachbaur D., Larcher C., Kircher B. et al. Risk for cytomegalovirus infection following reduced intensity allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2003;82:621–7.
16. Shi-Xia X., Hai-Qin X., Xian-Hua T. et al. Comparison of reduced intensity and myeloablative conditioning regimens for stem cell transplantation in patients with malignancies: a meta-analysis. *Clin Transplant* 2011;25(2):E187–98.
17. Patel S.R., Ridwan R.U., Ortin M. Cytomegalovirus reactivation in pediatric hemopoietic progenitors transplant: a retrospective study on the risk factors and the efficacy of treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;27:411–5.
18. Schetelig J., Oswald O., Steuer N. et al. Cytomegalovirus infections in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:695–701.
19. Cantoni N., Hirsch M., Khanna N. et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1309–14.
20. Ljungman P., de la Camara R., Einsele H. et al. Recommendations for CMV and HHV-6 management in patient with hematological diseases. 4th European Conference on infections in leukemia, 2011.
21. Behrendt C.E., Rosenthal J., Bolotin E. et al. Donor and recipient CMV serostatus and outcome of pediatric allogeneic HSCT for acute leukemia in the era of CMV-preemptive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:54–60.
22. Einsele H., Hebart H., Kauffmann-Schneider C. et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:757–63.
23. Zaia J.A., Schmidt G.M., Chao N.J. et al. Preemptive ganciclovir administration based solely on asymptomatic pulmonary cytomegalovirus infection in allogeneic – recipients: long-term follow-up. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995;1:88–93.
24. Söderberg-Nauclér C., Fish K.N., Nelson J.A. et al. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997;91:119.
25. Söderberg-Nauclér C., Streblov D.N., Fish K.N. et al. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14⁺ monocytes is differentiation dependent. *J Virol* 2001;75(16):7543–54.
26. Hambach L., Stadler M., Dammann E. et al. Increased risk of complicated CMV infection with the use of mycophenolate mofetil in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:903–6.
27. George B., Kerridge I., Gilroy N. et al. Fludarabine-based reduced intensity conditioning transplants have a higher incidence of cytomegalovirus reactivation compared with myeloablative transplants. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:849–55.
28. Zhuravskaya T., Maciejewski J.P., Netski D.M. et al. Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood* 1997;90(6):2482–91.
29. Reddy V., Meier-Kriesche H.U., Greene S. et al. Increased levels of tumor necrosis factor alpha are associated with an increased risk of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(9):698–705.
30. Ljungman P., Perez-Bercoff L., Jonsson J. et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006;91:78–83.
31. Pinana J.L., Martino R., Barba P. et al. Cytomegalovirus infection and disease after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:534–42.
32. Junghans C., Boeckh M., Carter R.A. et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002;99:1978–85.
33. Paulin T., Ringden O., Nilsson B. et al. Variables predicting bacterial and fungal infections after allogeneic marrow engraftment. *Transplantation* 1987;43:393–8.
34. Аверьянова М.Ю., Вавилов В.Н., Бондаренко С.Н. и др. Бактериальные инфекции у пациентов детского и подросткового возраста после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток: этиология, структура, факторы риска. *Журн инфектологии* 2013;5(1):35–43.
35. Larsson K., Aschan J., Remberger M. et al. Reduced risk for extensive chronic graft-versus-host disease in patients receiving transplants with human leukocyte antigen-identical sibling donors given polymerase chain reaction-based preemptive therapy against cytomegalovirus. *Transplantation* 2004;77(4):526–31.
36. Fletcher J.M., Prentice H.G., Grundy J.E. Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV) – infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV-induced down-regulation of cell surface class I HLA. *J Immunol* 1998;161(5):2365–74.
37. Erard V., Guthrie K.A., Riddell S., Boeckh M. Impact of HLA A2 and cytomegalovirus serostatus on outcomes in patients with leukemia following matched-sibling myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematologica* 2006;91(10):1377–83.

Фармакокинетика колистина и расчет суточной дозы колистиметата натрия у детей с химиоиндуцированной нейтропенией

В.И. Захаревич, В.В. Дмитриев

ГУ РНПЦ ДОГИ

Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск

Контакты: Вячеслав Васильевич Дмитриев dmitrievhaematol@mail.ru

Применение стандартного фракционного режима введения колистиметата натрия не позволяет в большинстве случаев достичь целевых значений индекса площадь под фармакокинетической кривой / минимальная ингибирующая концентрация (AUC/MIC), определяющих фармакологическую эффективность колистина. Использование предлагаемого алгоритма расчета суточной дозы колистиметата натрия увеличивает частоту достижения концентрации колистина, обеспечивающей значения AUC, достаточных для изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, имеющих MIC колистина 0,75–1 мг/л. При фракционном режиме введения рекомендуемой инструкцией суточной дозы целевые значения AUC для MIC 1 г/л достигались лишь в 19 % случаев, при использовании предлагаемого алгоритма внутривенного введения с постоянной скоростью в течение длительного времени суточной дозы колистиметата натрия 100 000 МЕ/кг – в 60 % (у 3 из 5 пациентов).

Ключевые слова: колистин, фармакокинетика, расчет дозы, дети, злокачественные новообразования и гемобластозы, инфекционные осложнения

Colistine pharmacokinetics and Colistimethate sodium daily dose calculation in children with chemotherapy induced neutropenia

V.I. Zakharevich, V.V. Dmitriev

Republican Scientific Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of Republic of Belarus, Minsk

A standard fractional Colistimethate sodium dosing regimen does not allow in most cases reach the target values of AUC/MIC index, determining the Colistine pharmacological efficacy. Use of the proposed algorithm for daily dose calculating increases the incidence to achieve Colistine concentration providing AUC values, sufficient for *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* with Colistine MIC 0.75–1 mg/l. Using fractional administration of recommended daily dose target AUC values for MIC 1 g/l achieved only in 19 % cases, whereas using the proposed algorithm of intravenous injection with long-time constant rate of daily dose 100.000 ME/kg Colistimethate sodium – in 60 % (in 3 of 5 patients).

Key words: Colistine, pharmacokinetics, dose calculation, children, malignant neoplasms, hematological malignancies, infectious complications

Введение

Увеличение числа случаев инфекционных осложнений, вызванных госпитальными штаммами *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, обладающими множественной лекарственной устойчивостью к подавляющему большинству антибактериальных лекарственных средств, представляет серьезную проблему для пациентов любого профиля, особенно в состоянии фебрильной нейтропении [1, 2]. Колистин, известный как полимиксин Е, – первый антибиотик с доказанным «противосинежной» эффектом [3, 4]. Колистин является многокомпонентным полипептидным антибиотиком, содержащим 2 основных компонента: колистин А (полимиксин Е1) и колистин В (полимиксин Е2). В медицинской практике доступны 2 лекарственных формы: 1-я – колистина сульфат для местного применения и приема внутрь; 2-я – колистина метансульфонат натрия (колистиметат натрия), рекомендованная для парентерального применения путем

внутривенных или внутримышечных инъекций, или в виде аэрозоля. Колистиметат натрия в водной среде при температуре 37 °С способен к гидролизу с образованием сульфометилированных производных и колистина. Лекарственное средство, содержащее колистиметат натрия, продукты его гидролиза и колистин, обладая такими же антимикробными свойствами, менее токсично, чем колистина сульфат [5–7]. Колистиметат натрия является неактивным пролекарством колистина, и именно активный колистин обеспечивает антимикробный эффект препарата [8]. Данных о фармакокинетике колистина и колистиметата натрия у детей с сепсисом в состоянии нейтропении, индуцированной химиотерапией, в связи со злокачественным новообразованием в публикациях не приведено.

Цель исследования – изучить фармакокинетику колистина и определить принципы коррекции суточной дозы колистиметата натрия для парентерального введения у детей с химиоиндуцированной нейтропенией.

Материалы и методы

Для количественного определения колистина в сыворотке крови нами был применен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрией. При разработке условий разделения, пробоподготовки и выбора параметров работы масс-детектора за основу взяты литературные данные [9, 10]. В работе использовали жидкостный хроматограф Agilent 1200, соединенный с тандемным масс-спектрометром Agilent 6410 Triple Quad («тройной квадруполь»). Разделение компонентов проб выполняли на колонке ZORBAX SB C18 (2,1 × 30 мм; 3,5 мкм) при температуре +30 °С. Качественный и количественный анализ хроматограмм и масс-спектров проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B. 01.03 (Agilent Technologies Inc., USA).

Реактивы и материалы: ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Fisher Chemical), муравьиная кислота (Acros), серная кислота (чистая для анализа — ч.д.а.), цинка сульфат (ч.д.а.), натрия гидроксид (ч.д.а.), вода деионизованная, контрольная сыворотка с биохимическими параметрами, близкими к таковым у здорового человека. Натриевая соль колистина метансульфоната (colistimethate sodium) «колистиметат натрия» Colomycin® производства Forest Laboratories UK Ltd (Dartford, Kent, Великобритания), 1 мг которого эквивалентен 12 500 МЕ, являлась стандартом для приготовления калибровочных растворов. Расчеты концентраций веществ в испытуемых растворах выполняли методом внешнего стандарта по калибровочным зависимостям.

После получения информированного согласия родителей в исследование были включены дети в возрасте от 3 до 18 лет (11 мальчиков и 10 девочек) как с солидными злокачественными новообразованиями, так и с гемобластомами на различных этапах лечения. У всех пациентов на момент исследования зарегистрирована индуцированная химиотерапией нейтропения (уровень нейтрофилов < 500 клеток в мкл). Пациенты с тяжелым сепсисом и септическим шоком (13 человек) получали колистин в качестве компонента эмпирической дезэскалационной или этиотропной антибактериальной терапии, пациенты контрольной группы (8 человек) получали колистин в качестве антибиотикопрофилактики. Решение о назначении колистина в каждом случае было инициировано лечащим врачом. Показаниями для назначения колистина в качестве антибиотикопрофилактики была предшествующая колонизация или инфекция у данного пациента, вызванная чувствительными только к колистину микроорганизмами. Для внутривенного введения использовали лекарственное средство колистиметат натрия Colomycin® производства Forest Laboratories UK Ltd (Dartford, Kent, Великобритания), 1 мг которого эквивалентен 12 500 МЕ. Введение суточной дозы лекарственного средства, разрешенной инструкцией по

медицинскому применению колистиметата натрия, осуществляли путем 30-минутной инфузии 25 000–50 000 МЕ/кг каждые 8 ч. Фармакокинетическое исследование проводили через 36–48 ч после первого введения лекарственного средства по достижении им стационарной концентрации. Взятие крови из центрального венозного катетера для определения концентрации колистина и колистиметата натрия в крови пациентов проводили в определенные временные интервалы: непосредственно перед очередным введением препарата; непосредственно после завершения инфузии препарата (ч = 0); через 1 ч после завершения инфузии препарата (ч + 1); через 2 ч после завершения инфузии препарата (ч + 2); через 4 ч после завершения инфузии препарата (ч + 4); через 8 ч после завершения инфузии препарата (ч + 8). Не позднее 30 мин от момента взятия крови сыворотку в объеме не более 500 мкл в пластиковых пробирках типа «эппендорф» помещали в морозильную камеру с температурой –20 °С, где хранили до момента выполнения исследования не более 1 мес [11]. На протяжении 24 ч от начала фармакокинетического исследования дополнительно определяли клиренс эндогенного креатинина (КЭК) методом Реберга–Тареева с использованием технических нормативно-правовых актов, регламентирующих процесс, и средств измерения, разрешенных для применения в организации здравоохранения. Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) колистина по отношению к изолятам *P. aeruginosa* (30 изолятов), *A. baumannii* (30 изолятов) и *K. pneumoniae* (30 изолятов), выделенным из крови пациентов с сепсисом с 2003 по 2013 г., определена методом E-test. Test Strip производства LIOFILCHEM (Italy).

Методы статистической обработки включали определение в каждом вариационном ряду средних значений, ошибки среднеквадратичного отклонения и расчет величин $\pm 95\%$ доверительный интервал (95 % ДИ). Достоверность различий определяли по критерию Манна–Уитни (U-test), а для попарно связанных вариантов — по критерию Вилкоксона (T-test) с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. Расчеты фармакокинетических параметров произведены для однокамерной модели с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 с использованием трапецеидального правила. Рассчитана площадь под фармакокинетической кривой (AUC) колистина, а также фармакокинетические параметры колистиметата натрия: AUC, видимый объем распределения, общий клиренс (Cl), период полувыведения ($T_{1/2}$). Фармакокинетическое моделирование производилось с помощью пакета программного обеспечения R.

Результаты исследования

Перед введением пациентам контрольной группы очередной дозы колистиметата натрия исходное содержание колистиметата натрия в крови в среднем составляло 0,08 мг/л, изменяясь в пределах 95 % ДИ

от 0,07 до 0,24 мг/л. Непосредственно после завершения внутривенной инфузии колистиметата натрия выявлено повышение содержания в крови колистиметата от 1,4 до 5,11 мг/л, что в среднем составило 3,25 мг/л. Исходная концентрация колистина – 0,34 (0,14–0,54) мг/л – по достижении им стационарной концентрации у пациентов с сепсисом была выше ($p = 0,032$), чем величина аналогичного показателя 0,08 (0,014–0,15) мг/л у детей контрольной группы. Исходная концентрация колистиметата натрия 0,06 (0,02–0,1) мг/л была такой же, как и в контроле – 0,08 (0,07–0,24) мг/л (табл. 1). После введения очередной дозы колистиметата натрия концентрация колистиметата в крови повысилась до 3,74 (2,16–5,31) мг/л, что не отличалось ($p = 0,9$; U-test) от величины данного показателя в контроле – 3,25 (1,4–5,11) мг/л.

Концентрация колистина в крови в этот момент составила 1,03 (0,77–1,29) мг/л, что также не превышало аналогичный показатель у детей, не имевших сепсиса. Через 8 ч концентрации колистина и его предшественника не отличались от исходных значений.

Таблица 1. Концентрация (мг/л) колистина и колистиметата натрия у детей в состоянии нейтропении, индуцированной химиотерапией, средние значения ($\pm 95\%$ ДИ)

Группа пациентов и этап исследования	Колистин	Колистиметат натрия
Контроль, n = 8 перед очередным введением	0,08 (0,014–0,15)	0,08 (0,07–0,24)
после введения	1,02 (0,39–1,65)	3,25 (1,40–5,11)
через 1 ч	0,70 (0,15–1,26)	1,84 (1,19–2,48)
через 2 ч	0,52 (0,08–0,96)	0,96 (0,55–1,38)
через 4 ч	0,33 (0,02–0,63)	0,33 (0,07–0,59)
через 8 ч	0,21 (0,002–0,41)	0,15 (0,09–0,4)
Сепсис, n = 13 перед очередным введением	0,34 (0,14–0,54)	0,06 (0,02–0,10)
после введения	1,03 (0,77–1,29)	3,74 (2,16–5,31)
через 1 ч	0,82 (0,55–1,09)	1,10 (0,67–1,52)
через 2 ч	0,70 (0,43–0,97)	1,01 (0,39–1,63)
через 4 ч	0,51 (0,27–0,74)	0,33 (0,18–0,49)
через 8 ч	0,34 (0,14–0,54)	0,07 (0,02–0,12)

AUC колистина достигла 18,755 (11,599–25,911) мг \times сут/л у пациентов с сепсисом и 11,356 (3,635–19,076) мг \times сут/л у пациентов контрольной группы ($p = 0,149$). Максимальная концентрация колистина (C_{max}) у пациентов с сепсисом и в контрольной группе составила 1,16 (0,84–1,49) и 0,96 (0,41–1,51) мг/л соответственно ($p = 0,44$).

Эффективность колистина определяет соотношение AUC/MIC. Целевое значение данного индекса, по мнению исследователей, составляет 27,6–45,9 [12].

Рассчитана частота достижения целевых значений индекса AUC/MIC в зависимости от MIC колистина по отношению к возбудителям, выделенным при исследовании гемокультур пациентов с доказанным сепсисом, в ГУ РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии с 2003 по 2013 г. Все изоляты *K. pneumoniae* имели по отношению к колистину MIC ≥ 1 мг/л, вследствие чего предполагаемая частота достижения целевых значений AUC/MIC при применении стандартного режима дозирования колистиметата натрия была очень низка: 19 % для штаммов с MIC 1 мг/л и 0 % при MIC > 1 мг/л. Для изолятов *A. baumannii*, имеющих MIC колистина $\leq 0,1$ мг/л (всего 3,4 % изолятов), частота достижения целевых значений AUC/MIC составила 100 %, при MIC = 0,5 мг/л (13,3 % изолятов) – 38 %, при MIC = 0,75 мг/л (23,3 % изолятов) – 33 %, при MIC = 1 мг/л (46,7 % изолятов) – 19 %. При MIC > 1 мг/л (13,3 % изолятов) невозможно достижение целевых значений индекса AUC/MIC при применении стандартных режимов дозирования колистиметата натрия. Для изолятов *P. aeruginosa*, имеющих MIC-0,75 мг/л (всего 16,7 % изолятов), предполагаемая частота достижения целевых значений AUC/MIC составила 33 %, при MIC = 1 мг/л (50 % изолятов) – 19 %, при MIC > 1 мг/л (33,3 % изолятов) невозможно достижение целевых значений индекса AUC/MIC при применении стандартных режимов дозирования. Все изоляты *K. pneumoniae*, 83,3 % изолятов *P. aeruginosa* и 60 % изолятов *A. baumannii* имели MIC ≥ 1 мг/л, что делает в данных случаях возможность достижения целевых значений индекса AUC/MIC очень низкой. Данное обстоятельство определяет недостаточный эффект антибактериальной терапии инфекций, вызванных данными патогенами, при применении стандартного фракционного режима дозирования путем 30-минутной инфузии 25 000–50 000 МЕ/кг каждые 8 ч.

Фармакокинетику колистиметата натрия описывает однокамерная модель. Выявлена тесная корреляция между AUC колистиметата натрия (зависящей, в свою очередь, от КЭЖ) и AUC активного колистина. Это позволило построить модель, предсказывающую AUC колистина, на основе которой можно прогнозировать эффективность терапии и подбирать дозу колистиметата натрия, создающую концентрацию колистина, эффективную в отношении микроорганизмов с известной MIC.

Выполнение расчетов по определению константы элиминации колистина (k_{el}), целевого значения AUC колистина ($AUC_{цель}$), целевого значения AUC колистиметата натрия ($AUC_{снсцель}$) и с учетом величины MIC колистина, а также поиск величины суточной дозы колистиметата натрия представляют сложный процесс. Для удобства работы практического врача нами разработана номограмма, включающая значения MIC колистина с шагом 0,1 мг/л, 0,25 мг/л, 0,5 мг/л, 0,75 мг/л, и значения КЭЖ на момент расчетов от 30 до 200 мл/м² \times мин с шагом 5 мл/м² \times мин. С помощью данной но-

мограммы (табл. 2) в точке пересечения значений, определенных лабораторно, КЭК и МИС колистина находят величину суточной дозы колестиметата натрия, позволяющую с максимальной вероятностью достигнуть целевого значения индекса (AUC/МИС) – 27,6–45,9, при котором будет обеспечена эффективность лекарственного средства.

Таблица 2. Расчетная доза колестиметата натрия в зависимости от КЭК и МИС колистина

КЭК, мл/м ² × мин	МИС г/л колистина по отношению к выделенному патогену			
	0,1	0,25	0,5	0,75
30	30 000	30 000	30 000	60 000
35	30 000	30 000	30 000	60 000
40	30 000	30 000	30 000	60 000
45	50 000	50 000	50 000	70 000
50	50 000	50 000	50 000	90 000
55	50 000	50 000	50 000	90 000
60	50 000	50 000	50 000	90 000
65	50 000	50 000	50 000	90 000
70	50 000	50 000	50 000	110 000
75	50 000	50 000	50 000	110 000
80	50 000	50 000	50 000	120 000
85	50 000	50 000	50 000	130 000
90	50 000	50 000	50 000	130 000
95	50 000	50 000	50 000	140 000
100	50 000	50 000	50 000	140 000
105	50 000	50 000	50 000	150 000
110	50 000	50 000	60 000	*
115	50 000	50 000	90 000	*
120	50 000	50 000	110 000	*
125	50 000	50 000	110 000	*
130	50 000	50 000	130 000	*
135	50 000	50 000	130 000	*
140	50 000	50 000	140 000	*
145	50 000	50 000	140 000	*
150	50 000	50 000	*	*
155	50 000	50 000	*	*
160	50 000	50 000	*	*
165	50 000	50 000	*	*
170	50 000	50 000	*	*
175	50 000	50 000	*	*
180	50 000	50 000	*	*
185	50 000	60 000	*	*
190	50 000	70 000	*	*
195	50 000	90 000	*	*
200	50 000	110 000	*	*

Примечание. * – при данных параметрах КЭК и величины МИС фракционное болюсное введение суточной дозы лекарственного средства в виде 30-минутной инфузии 25 000–50 000 МЕ/кг каждые 8 ч не позволит достичь целевого значения показателя AUC/МИС = 27,6–45,9, обеспечивающего фармакологическую эффективность препарата.

Для повышения вероятности достижения целевых значений AUC/МИС мы модифицировали режим введения с учетом данных о том, что колистину присущ смешанный тип действия – как концентрационно-зависимый (причем известно, что введение доз, рекомендованных производителем, не всегда позволяет создать эффективную концентрацию, зачастую даже пиковая концентрация не превышает МИС возбудителей), так и зависимый от AUC, что вкпе с невыраженным постантибиотическим эффектом создает предпосылки для использования такого режима дозирования, который позволяет постоянно поддерживать эффективную концентрацию в плазме крови. Модифицированный режим введения представлял собой следующее: вводили разовую дозу 75 000–100 000 МЕ/кг в течение 30 мин, затем (без паузы) начинали круглосуточную непрерывную инфузию в суточной дозе 100 000 МЕ/кг.

Для подтверждения эффективности в достижении целевых значений фармакологического индекса колистина была определена концентрация колестиметата и колистина в крови у 5 детей с химиоиндуцированной нейтропенией и сепсисом, получавших антибиотик в расчетной дозе, путем длительной непрерывной инфузии колестиметата натрия в течение суток с постоянной скоростью (табл. 3).

Таблица 3. Концентрация колестиметата натрия и колистина, AUC колистина при непрерывном круглосуточном введении колестиметата натрия с постоянной скоростью 100 000 МЕ/кг

Пациент	Концентрация колестиметата натрия (мг/л)	Концентрация колистина (мг/л)	AUC колистина (мг × сут/л)
№ 1	1,311	0,5087	12,208
№ 2	1,806	1,172	28,128
№ 3	2,014	1,218	29,232
№ 4	1,954	1,152	27,648
№ 5	1,153	0,958	22,992

Применение режима дозирования в виде непрерывного круглосуточного введения колестиметата натрия с постоянной скоростью увеличило частоту достижения концентрации, обеспечивающей значения AUC, достаточных для изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, имеющих МИС колистина 1 мг/л. При фракционном режиме введения целевые значения AUC для данного МИС были достигнуты лишь в 19,05 % случаев, при непрерывном круглосуточном введении с постоянной скоростью – в 60 % (у 3 из 5 пациентов).

Таким образом, применение стандартного фракционного режима введения колестиметата натрия не позволяет в большинстве случаев достичь целевых значений индекса AUC/МИС. Использование предлагаемого алгоритма расчета суточной дозы колестиметата натрия увеличивает частоту достижения концентрации,

обеспечивающей значения AUC, достаточные для изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, имеющих MIC колистина 0,75–1 мг/л. При фракционном режиме введения рекомендуемой инструкцией суточной дозы целевые значения AUC для MIC 1 г/л достигались лишь в 19 % случаев, при использовании предлагаемого алгоритма внутривенного введения суточной

дозы колестиметата натрия 100 000 МЕ/кг – в 60 % (у 3 из 5 пациентов).

Необходимы дальнейшие исследования для определения эффективности и безопасности альтернативных режимов введения колестиметата для достижения эффективных концентраций, в том числе при инфекциях, вызванных штаммами микроорганизмов с MIC > 1 мг/л.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Giamarellou H., Antoniadou A. Antipseudomonal antibiotics. Med Clin N Am 2001;85:19–42.
2. Evans M.E., Feola D.J., Rapp R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. Ann Pharmacother 1999;33:960–7.
3. Barnett M., Bushby S.R., Wilkinson S. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. Br J Pharmacol 1964;23:552–74.
4. Schwartz B.S., Warren M.R., Barkley F.A., Landis L. Microbiological and pharmacological studies of colistin sulphate and sodium colistin methanesulfonate. Antibiotics Annu 1959–1960;7:41–60.
5. Li J., Turnidge J., Milne R. et al. *In vitro* pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:781–5.
6. Li J., Milne R.W., Nation R.L. et al. Simple method for assaying colistin methanesulfonate in plasma and urine using high-performance liquid chromatography. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(10):3304–7.
7. Li J., Coulthard K., Milne R. et al. Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother 2003;52:987–92.
8. Bergen P.J., Li J., Rayner C.R. et al. Colistin methanesulfonate is an inactive pro-drug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1953–8.
9. Gobin P., Lemaître F., Marchand S. et al. Assay of colistin and colistin methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(5):1941–8.
10. Dotsikas Y., Markopoulou C.K., Koundourellis J.E. et al. Validation of novel LC–MS/MS method for the quantitation of colistin A and B in human plasma. J Sep Sci 2011;34:37–45.
11. Gobin P., Lemaître F., Marchand S. et al. Stability of colistimethate sodium in aqueous solution. Antimicrob Agents Chemother 2012;56(12):6432–3.
12. Bergen P.J., Li J., Nation R.L. Dosing of colistin – back to basic PK/PD. Curr Opin Pharmacol 2011;11(5):464–9.

Генетическая рестрикция гуморального иммунного ответа

Л.Л. Головкина

ФГБУ ГНЦ Минздрава России, Москва

Контакты: Лариса Леонидовна Головкина largol@mail.ru

В обзоре приводятся сведения о путях инициации иммунного ответа при попадании в организм человека чужеродных агентов. Показано значение отдельных молекул главного комплекса гистосовместимости в запуске антителообразования после трансфузий компонентов крови, в процессе беременности, после трансплантации органов вследствие несовместимости антигенных структур донора и реципиента, матери и ребенка. Подробно описано значение строения белковых молекул антигенов тромбоцитов в распознавании их иммунокомпетентными клетками.

Ключевые слова: рестрикция иммунного ответа, гены и антигены главного комплекса гистосовместимости системы HLA, тромбоцитспецифические гены системы HPA, аллоиммунизация, трансфузиология, неонатальная аллоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, органная трансплантация

Genetic restriction of humoral immune response

L. L. Golovkina

Hematology Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow

The review provides information about immune response initiation against foreign agents. Significance of separate molecules of major histocompatibility complex in antibodies formation after blood transfusion, during pregnancy, after organ transplantation due to incompatibility of the antigenic structures of donor and recipient, mother and child was shown. Detailed description of platelet antigens protein structure significance in immunocompetent cells recognition of them is provided.

Key words: immune response restriction, genes and antigens of major histocompatibility complex HLA (Human Leukocyte Antigens), platelet-specific genes of HPA system (Human Platelet Antigens), alloimmunization, transfusiology, neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura, organ transplantation

Антигены главного комплекса гистосовместимости — HLA (Human Leukocyte Antigens) — выполняют разнообразные функции в организме человека, самой главной из которых является обеспечение постоянства внутренней среды. Поддержание гомеостаза достигается путем распознавания чужеродных агентов, отличающихся от собственных структур. Способность распознавания «своего» и «чужого» появляется уже у самых примитивных организмов [1]. У высокоорганизованных организмов этот механизм служит для осуществления иммунной защиты от патогенов и является следствием эволюции иммунной системы под влиянием внешней среды [2]. В 1974 г. Rolf Zinkernagel и Peter Doherty впервые доказали, что в процесс Т-клеточного распознавания чужеродных пептидов вовлечены антигены главного комплекса гистосовместимости, и назвали этот феномен МНС-рестрикцией (МНС, Major Histocompatibility Complex) [3, 4]. В дальнейшем ими было установлено, что молекулы HLA I класса участвуют в инициации клеточного иммунного ответа на эндогенные пептиды, а молекулы HLA II класса — гуморального иммунного ответа на экзогенные белки [5].

Специфический иммунный ответ на чужеродные пептиды иницируется путем активации Т-хелперов после распознавания ими пептида в комплексе с HLA II класса антигенпрезентирующих клеток (АПК) — активированных макрофагов, дендритных клеток,

В-лимфоцитов. Функция АПК заключается в процессе — поглощении и расщеплении чужеродного белка до мелких фрагментов длиной 9–25 аминокислот, которые могут поместиться в пептидсвязывающую бороздку молекулы HLA и быть представленными на клеточной поверхности. Рецепторы Т-лимфоцитов распознают комплекс HLA + пептид при прохождении клеток через селезенку или лимфатические узлы. Для успешной активации Т-лимфоцитов необходим дополнительный стимул от взаимодействия с костимуляторными молекулами (CD28—CD80/86) и цитокинов. Активированный таким образом Т-лимфоцит выполняет свои эффекторные функции посредством стимуляции В-лимфоцитов, начинающих продукцию специфических антител, или Т-цитотоксических лимфоцитов [6].

Целый ряд исследований, посвященных изучению механизмов взаимодействия иммунокомпетентных клеток при реализации иммунного ответа, в частности структуры пептидсвязывающей бороздки антигенов главного комплекса гистосовместимости человека, доказали роль генетических факторов в развитии патологических процессов, наличие ассоциаций между структурами HLA I и II класса и предрасположенностью к реализации как клеточного, так и гуморального ответа. Первые исследования этих ассоциаций касались изучения предрасположенности людей к разным

заболеваниям. Работы, выполненные в 1970–1980-х годах в Советском Союзе, показали, что присутствие определенных молекул HLA может как способствовать развитию заболевания, так и определять резистентность организма к патологическим процессам [7, 8]. Причины этих явлений следуют из того факта, что разные аллели HLA II класса формируют неодинаковые по конфигурации антигенсвязывающие щели, оптимальное конформационное соответствие которых антигенам будет способствовать высокому иммунному ответу или резистентности организма к заболеванию [9].

В трансфузиологии понимание причин развития иммунологических реакций после переливания компонентов крови особенно важно, так как последствия гемокомпонентной терапии могут быть фатальными. Одной из самых частых причин посттрансфузионных осложнений является присутствие в организме реципиентов аллоиммунных антител, взаимодействующих с антигенами донорских клеток крови. На развитие аллоиммунитетов влияют многие факторы, среди которых выделяют 2 основных – не зависящие и зависящие от генетических особенностей организма реципиента. К факторам, не зависящим от реципиента, относят дозу, способы введения и иммуногенность антигенов. К факторам, зависящим от реципиента, принято относить:

1. Предшествующие беременности и/или трансфузии – у женщин, имевших в анамнезе беременности, антитела к антигенам разных систем вырабатываются чаще, чем у женщин без акушерского и мужчин без трансфузионного анамнезов [10, 11].

2. Нозологическую форму заболевания. Было отмечено снижение антителогенеза у больных с лимфопролиферативными заболеваниями, что можно объяснить функциональной неполноценностью Т- и В-лимфоцитов, развивающихся из патологического клона [12, 13]. К факторам риска аллоиммунитетов относят апластическую анемию, миелодиспластический синдром [14, 15]. Повышенную склонность к аллоиммунитетам у больных с опухолевыми процессами в различных органах объясняют повышением активности клеток иммунной системы [12].

3. Наличие аутоиммунных процессов провоцирует продукцию и аллоиммунных антител [16, 17]. Доказана положительная коррелятивная связь между аллоиммунитетом и аутоиммунитетом, спровоцированным трансфузиями несовместимых по антигенной структуре гемокомпонентов [18, 19].

4. Отсутствие у больных селезенки, являющейся фильтрующей системой организма, может приводить к конформационным изменениям мембраны донорских эритроцитов и появлению скрытых антигенных детерминант. Принято считать, что после спленэктомии происходит увеличение длительности циркуляции поврежденных эритроцитов в периферическом русле и, как следствие, – усиление аллоиммунитетов [16].

5. Количество трансфузий: при увеличении частоты переливаний компонентов крови увеличивается

и риск попадания в организм больного аллоантигенов, не совпадающих по антигенной структуре с белками и/или олигосахарами (система АВО) организма реципиента [20].

6. Различия по антигенам реципиента и донора компонентов крови [12], в том числе расовая принадлежность реципиента и доноров компонентов крови. В генетически однородной популяции полиморфизм антигенов может быть не сильно выражен, и частота аллоиммунитетов будет низкой. При межэтнических трансфузиях следует учитывать частоты высокоиммунных антигенов в популяциях.

7. Наличие микробной инфекции, играющей роль адьюванта, стимулирует иммунный ответ за счет индукции экспрессии костимуляторных молекул CD80, CD86, CD40L, CD30L, CD40 на дендритных клетках реципиента и, как следствие, увеличивает пролиферацию специфических CD4⁺ Т-лимфоцитов и активацию нативных CD4⁺ Т-лимфоцитов [21, 22]. Нами было показано усиление антителообразования к антигенам тромбоцитов систем HLA и HPA (Human Platelet Antigens) у больного М. после развития септических осложнений [23].

8. Генетическая предрасположенность к антителообразованию [24, 25], о чем речь пойдет ниже.

В трансфузиологии первые работы по доказательству положительной корреляции между определенными структурами HLA и склонностью к антителогенезу были посвящены изучению образования антиэритроцитарных антител у больных, нуждающихся во множественных трансфузиях эритроцитов. Было установлено, что присутствие HLA-B35 у больных серповидноклеточной анемией ассоциировалось с предрасположенностью к образованию аллоиммунных антиэритроцитарных антител [26]. Гаплотип HLA-A1, -B8 чаще выявляли у аллоиммунизированных больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) после аутотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток [27]. В 2013 г. появились работы, посвященные более детальному изучению связи HLA II класса и образования специфических аллоиммунных антител к антигенам систем Резус [28], Даффи, Келл, Кидд [29, 30].

Изучение HLA-рестрикции специфического гуморального иммунного ответа при трансфузиях тромбоцитов относят к новым перспективным направлениям [31]. Хорошо известно, что несовместимость реципиента и донора по антигенной структуре тромбоцитов может привести к развитию таких патологических состояний, как посттрансфузионная тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионные реакции негемолитического типа (иммунологическая рефрактерность к переливаемым тромбоцитам, фебрильные реакции) и др. [32]. Разнообразие тромбоцитспецифических аллоантигенов связано с заменой единичных нуклеотидов в аллельспецифическом сайте генов, что приводит к замене одной аминокислоты в структуре белковой молекулы антигена. Например, поли-

морфный участок в позиции 33 белка-интегрин β_3 является ответственным за инициацию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Аминокислота Leu в позиции 33 белковой молекулы антигена HPA-1a формирует эпитоп, распознаваемый аллоантителами, генерируемыми иммунной системой людей, гомозиготных по присутствию аминокислоты Pro³³ (HPA-1b) [33]. R.D. Bowditch et al. [34] в своих опытах продемонстрировали, что аминокислотные замены способствуют изменению способности белков к связыванию с Т-лимфоцитами вследствие изменения пространственной конфигурации зрелой пептидной молекулы гликопротеида GPIIb. Ими же было показано, что для формирования эпитопа HPA-1a необходимы локальные сульфгидрильные связи.

Более подробно формирование эпитопов для иммунологического распознавания описал S. Honda et al. [35]. Исследователи доказали, что для презентации антигенной структуры необходимы не только сами полиморфные участки (аминокислотные замены в позиции 33 – лейцин или пролин) интегрин β_3 , но и иные аминокислоты, локализованные на значительном расстоянии от самих полиморфных сайтов. Эти дистальные аминокислоты в позициях 26–38 образуют петлю из цистеинов, связанных дисульфидными связями, которая обеспечивает корректную ориентацию самой антигенной детерминанты, находящейся внутри. Иными словами, для формирования эпитопа HPA-1a или HPA-1b необходима трехмерная структура. Кроме того, важным для стабилизации антигена является и 2-я цистеиновая петля в позициях 287–490, которая при наличии лейцина локализована внизу первой цистеиновой петли, а при наличии пролина – выше первой петли. Изменение пространственной конфигурации молекулы интегрин приведет к тому, что для ее презентации потребуются различные антигены HLA-DR или HLA-DQ, способные презентировать ее иммунокомпетентным клеткам для инициации иммунного ответа.

Эту идею поддержали S. Wu et al. [36], которые тоже доказали влияние изменений в структуре пептидов тромбоцитов на изменение их способности к связыванию с Т-лимфоцитами. Ученые изучали действенность этого постулата путем использования синтетических пептидов, отвечающих за полиморфный регион, и клеточных МНС II класса насекомых. Ими было доказано, что белок с аминокислотой Leu³³ непосредственно связывался с рестриктированным аллелем главного комплекса гистосовместимости HLA-DR3*01:01, а белок, содержащий аминокислоту пролин в 33-й позиции, – нет. Иными словами, присутствие лейцина в 33-й позиции белка создает якорную специфичность для определенного аллеля HLA и определяет пептидсвязывающий мотив аллеля HLA-DR3*01:01.

J. Hammer et al. [37] подтвердили, что соединение молекулы HLA-DR и пептида происходит за счет якорных фрагментов последнего. Причиной отсутствия связывания белка, содержащего пролин, с моле-

кулой HLA может быть отсутствие этого якорного остатка. В молекуле HPA-1a якорная область для связывания с молекулой HLA II класса представлена белковым фрагментом с лейцином на С-конце внутреннего связывающего региона. С-концевой якорный фрагмент является критическим для связывания пептида с молекулой HLA II класса за счет наличия на нем выпуклого гидрофобного участка, комплементарного карману пептидсвязывающей бороздки молекулы HLA II класса.

Исследования стимуляции Т-лимфоцитов в культуре клеток продемонстрировали, что интегринальный пептид β_3 24-45Leu³³ может специфически стимулировать экспансию специфических Т-хелперов для определенного аллоантигена [38]. Последствие аллельспецифического связывания Leu³³ в свете вышесказанного заключается в том, что аминокислотный регион 24–45 антигенового интегрин β_3 Leu³³ непосредственно генерирует новые Т-клеточные эпитопы хелперов у HPA-1b/b индивидуумов. Для белка β_3 Pro³³ феномен HLA-рестрикции может быть связан с иным аллелем HLA. Возможно, для антителогенеза к белку β_3 Pro³³ нужны какие-то иные/дополнительные аминокислотные замены в структуре белковой молекулы, которые бы обеспечивали стимуляцию Т-хелперов или иные аллели HLA для связывания.

На основании проведенных исследований можно было бы предсказывать развитие однонаправленного (только против определенного антигена системы HPA) аллоиммунного ответа, так как Т-хелперы не свяжутся с каким-либо пептидом, то и иммунного ответа не будет. Идентификация Т-клеточных эпитопов была бы полезна в изучении Т-клеточных рецепторов белковых антагонистов для наведения ингибции специфических аллореактивных Т-клеток, что привело бы к ингибции продукции специфических аллоантител [39].

Мы изучали антителообразование к антигенам систем HLA и HPA у больных заболеваниями системы крови после многочисленных трансфузий тромбоцитов. Было установлено, что у больных апластической анемией, имеющих ген *HLA-DQB1*03:01*, достоверно чаще выявляли полиспецифические анти-HLA-антитела по сравнению с больными, у которых этот ген отсутствовал. Маркером предрасположенности к анти-HPA-5b антителогенезу у больных ОМЛ и острым миеломонобластным лейкозом был ген *HLA-DQB1*02*. У больных острым лимфобластным лейкозом с анти-HPA-1b антителами выявляли гаплотип *HLA-DRB1*07:01, -DQB1*02, *03:01* [40, 41].

Все исследователи, изучающие проблемы аллоиммунизации матерей при их несовместимости с плодом по тромбоцитспецифическим антигенам системы HPA, едины во мнении о существовании HLA-рестрикции гуморального иммунного ответа [42–44]. К этому выводу приходят на основании того, что только 10 % матерей, гомозиготных по HPA-1b/b, вырабатывают анти-HPA-1a-антитела во время беременности [6, 45, 46],

несмотря на то, что несовпадение по HPA матери и ребенка бывает намного чаще. Более того, было показано, что специфический гуморальный иммунный ответ на разные HPA рестриктирован и разными HLA. Например, в финской популяции анти-HPA6b антителообразование зависело от присутствия у матерей гаплотипа *HLA-DRB1*15:01, -DQA1*01:02, -DQB1*06:02* [44], а анти-HPA-1a антитела в канадской популяции вырабатывались только у женщин, имевших *HLA-DRB3*01:01 (HLA-DRw52a)* и *HLA-DQB1*02:01* [42]. В популяции Великобритании [47, 48], Норвегии [49] анти-HPA-1a антитела тоже выявляли у женщин, положительных по гену *HLA-DRB3*01:01*.

Группа Н. Sukati et al. [50] из Великобритании применяла для доказательства рестрикции иммунного ответа на HPA-1a метод стимуляции лимфоцитов женщин, гомозиготных по HPA-1b/1b и родивших детей с неонатальной аллоиммунной тромбоцитопенической пурпурой, синтетическими пептидами, имеющими в своем составе или лейцин, или пролин, локализованными близко к С-концевой части молекулы гликопротеида GPIIb. Авторы изучали влияние антигенов разных локусов HLA-D региона на пролиферативную активность лимфоцитов. Добавление в культуру клеток антител, направленных к антигенам локусов к HLA-DR, -DQ и -DP, снижало пролиферацию на 59, 44 и 22 % соответственно, что свидетельствовало о значительном влиянии на иммунный ответ в первую очередь антигенов локуса HLA-DR. По мнению ученых, антигены локуса HLA-DQ играли субдоминантную, а антигены локуса HLA-DP – незначительную роль. Только аллели *HLA-DRB3*01* были необходимы для взаимодействия с эпитопами Т-хелперов, в то время как аллель *HLA-DR*15* оказывал протективное воздействие на антителогенез. Ген *HLA-DQB1*02* был слабо ассоциирован с антителообразованием на HPA-1a, что позволило отнести его к вспомогательному локусу рестрикции иммунного ответа. Пролиферативный ответ лимфоцитов иммунизированных матерей авторы предлагают применять для прогнозирования тяжести аллоиммунной неонатальной тромбоцитопении (НАТП) у новорожденных. Сильный ответ в культуре материнских Т-лимфоцитов на стимуляцию пептидами с полиморфизмом Leu³³Pro сопровождался развитием у детей НАТП тяжелой, а средний ответ – средней степени тяжести [51]. Отрицательную корреляцию анти-HPA-5b антителогенеза и присутствия *HLA-DRB1*03:01* наблюдали у французских матерей [43, 52].

Французские ученые Р. Moncharmont et al. описали случай тяжелой НАТП, обусловленной анти-HLA-A2, анти-HLA-B18 и анти-HPA-15b антителами, перешедшими трансплацентарно от матери с генотипом HLA-A*01, *26; -B*49, *55; -DRB1*03, *04; -DRB3*02:02; -DQB1*02:01, *03:02; HPA-15a/a. Ее ребенок имел генотип HLA-A*01, *02; -B*18, *49; HPA-15a/b [53].

В органной трансплантологии остро стоит вопрос выживаемости трансплантата, длительности его функ-

ционирования, проблема аллоиммунизации больных, особенно нуждающихся в повторных пересадках. Исследователи пришли к заключению, что существует положительная коррелятивная связь между генетическими маркерами больных и их предрасположенностью к антителообразованию при трансплантации почки от донора, несовместимого по антигенам HLA I класса. Американские авторы Т.С. Fuller и А. Fuller [54] доказали существование по меньшей мере 2 генов – *HLA-DRB1*01* и *HLA-DRB1*03*, которые были ответственны за высокий риск развития аллоиммунизации по гуморальному типу и за недостаточность почечного трансплантата при несовместимости по HLA-Bw4.

Американцы Е. Heise et al. [55] изучали у 19 440 реципиентов, состоящих из 13 216 больных белой расы и 6224 больных иной расы, наличие коррелятивной связи HLA-фенотипов больных с увеличением или уменьшением риска антителообразования при пересадках от HLA-несовместимых доноров. Моновариантный анализ когорты показал, что 9 аллотипов HLA (HLA-DR1, -DR4, -DR7; -B8, -B12, -B40; -A1, -A2, -A11) были ассоциированы со значительным снижением риска аллоиммунизации, и 5 аллотипов HLA (HLA-B42, -B53; -A10, -A19, -A36) – с увеличением риска образования полиспецифических антител. Протективное действие к антителообразованию наблюдали у больных с антигенами HLA-DR1, -DR4, -DR7; -B12 (44,45); HLA-A1, A2. Более того, выявлены 5 комбинаций антигенов HLA-DR, -B, -A, ассоциированных с протективными свойствами: DR1-B35-A3; DR1-B35-A2; DR1-B44-A2; DR4-B44-A2; DR7-B57-A1 со средним значением снижения риска на 27 % на 1 комбинацию. Были установлены и фенотипы, ассоциированные с увеличением риска аллоиммунизации: HLA-DR2-B44-A2; HLA-DR2B53-A2; HLA-DR3-B8-A1; HLA-DR3-B42-A30; HLA-DR6-B42-A30; HLA-DR11-B53-A30 со средним увеличением риска на 70 % на 1 комбинацию.

А.С. Papassavas et al. [56] изучали рестрикцию анти-HLA-A2 антителогенеза по аллелям HLA-DRB1 у 217 больных после трансплантации несовместимой по HLA-A2 почки. У больных, имеющих аллели *HLA-DRB1*01:01* и *HLA-DRB1*14:01*, отмечена тенденция к положительной корреляции с продукцией специфических антител к общим эпитомам антигена HLA-A2 – 65-66GK и 62G соответственно. Присутствие аллеля *HLA-DRB1*15:01* у больных показало тенденцию к положительной корреляции с антителообразованием к частному эпитопу HLA-A2 74H. У 11 (26 %) из 42 больных с аллелем *HLA-DRB1*15:01* были выявлены антитела к эпитомам группы антигена HLA-A2. Более того, у этих больных выявляли антитела к другим антигенам системы HLA, не принадлежащим к группе HLA-A2, но имеющим с ним общие эпитопы.

Нидерландские ученые М.К. Dankers et al. [57] подтвердили, что иммуногенность несовместимых антигенов лейкоцитов системы HLA следует рассматривать в контексте HLA-DR-фенотипа больного, иссле-

дование которого полезно для предсказания силы аллоиммунного ответа. Была найдена корреляция между HLA-DR-фенотипом больных и специфическим ответом на антигены HLA I класса. Например, антитела к антигенам HLA-A10, -A11, -A19 и -B35 чаще выявляли у HLA-DR6 положительных индивидуумов, в то время как антитела к антигенам HLA-A3, -B5, -B7, -B8, -B12 чаще идентифицировали у HLA-DR4 положительных индивидуумов. Иными словами, доказано, что разные HLA-DR по-разному презентуют чужеродные пептиды Т-хелперам за счет разного строения пептидсвязывающей бороздки различных HLA-DR и что HLA-DR-фенотип больных играет ключевую роль в иммуногенности несовместимых анти-

генов системы HLA. Эти результаты демонстрируют, что выбор несовместимого по HLA I классу донора следует рассматривать в контексте HLA-DR-фенотипа больного, которому необходима трансплантация. Такая стратегия выбора доноров органов помогает уменьшить количество случаев отторжения трансплантата за счет выработки больными специфических антител и минимизировать степень аллоиммунизации у пациентов — кандидатов на повторную трансплантацию.

Таким образом, все исследователи доказали важную роль генов главного комплекса гистосовместимости в инициации гуморального иммунного ответа в трансфузиологии, акушерстве, трансплантологии и необходимости изучения этого направления.

ЛИТЕРАТУРА

- Nyholm S.V., Passeque E., Ludington W.B. et al. A candidate allorecognition receptor from a primitive chordate. *Immunity* 2006;25:163–73.
- Rinkevich B. Primitive immune systems: are you ways my ways? *Immunology Rev* 2004;198:25–35.
- Zinkernagel R.M., Doherty P.C. Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974;248:701–2.
- Zinkernagel R.M., Doherty P.C. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974;251:547–8.
- Doherty P.C., Zinkernagel R.M. A biological role for the Major Histocompatibility Antigens. *Lancet* 1975;1:1406–9.
- Semple J.W. Processed platelet HPA1a peptides au naturel. *Blood* 2009;114(9):1724–5.
- Тананов А.Т. Значение системы HLA в оценке степени риска возникновения и прогноза заболеваний. Дис. ... канд. мед. наук. М., 1982. 275 с.
- Тананов А.Т., Орлов-Морозов А.В. Система HLA-антигенов и болезни. Обзорная информация «Медицина и здравоохранение», серия «Терапия». М., 1982. 75 с.
- Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. С. 362–364.
- Бутина Е.В. Значение иммунологических факторов в развитии осложнений при трансфузиях компонентов крови у гематологических больных. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2001. С. 27.
- Murao M., Viana M.B. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(5):675–82.
- Bauer M.P., Wiersum-Osselton J., Schipperus M. et al. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion* 2007;47:2066–71.
- Golovkina L.L., Atroshchenko G.V., Krasnikova N.A. et al. Range of hematological disorders on the alloimmunization frequencies to HLA and HPA in Russian multitransfused patients. *J Transfus Med* 2012;5(2):83–4.
- Seyfried H., Walewska I. Analysis of immune response to red blood cell antigens in multitransfused patients with different diseases. *Mater Med Pol* 1990;22:21–5.
- Stiegler G., Speer W., Lobler C. et al. Red cell antibodies in frequently transfused patients with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol* 2001;80(6):330–3.
- Singer S.T., Wu V., Mignacca R. et al. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patient of predominantly Asian descent. *Blood* 2000;96:3369–73.
- Aygun B., Padmanabhan S., Paley C., Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion* 2002;42(Issue 1):37–43.
- Garratty G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion* 2004;44(1):5–9.
- Young P.P., Uzible A., Trulock E. et al. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion* 2004;44(1):67–72.
- Buetens O., Shirey R.S., Goble-Lee M. et al. Prevalence of HLA antibodies in transfused patients with and without red cell antibodies. *Transfusion* 2006;46(5):754–6.
- Hendrickson J.E., Desmarests M., Deshpande S. et al. Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion* 2006;46(9):1526–36.
- Hendrickson J.E., Chadwick T.E., Roback J.D. et al. Inflammation enhances consumption and presentation of transfused RBC antigen by dendritic cells. *Blood* 2007;110(7):2736–43.
- Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Кутьина П.М. и др. Появление полиспецифических антитромбоцитарных антител у больного с септическим осложнением. Пробл гематологии и переливания крови 2001;3:49.
- Reviron D., Dettori I., Ferrera V. et al. HLA-DRB1 alleles and Jk (a) immunization. *Transfusion* 2005;45:956–9.
- Noizat-Pirenne F., Tournamille C., Bierling P. et al. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion* 2006;46:1328–33.
- Alarif L., Castro O., Ofosu M. et al. HLA-B35 is associated with red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1986;38:178–83.
- Toor A.A., Choo S.Y., Little J.A. Bleeding risk and platelet transfusion refractoriness in patients with acute myelogenous leukemia who undergo autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:315–20.
- Vérhagen O.J.H.M., Della Valle L., Dohmen S. et al. HLA-DRB1*15 is not strongly linked to RHD immunization risk, but associated with high anti-D titers after hyperimmunization. *Vox Sang* 2013;105(Suppl. 1):235.
- Raos M., Unec R., Gojceta K. et al. The association of HLA System polymorphism with the development of clinically significant red blood cell antibodies. *Vox Sang* 2013;105(Suppl. 1):236.
- Schonewille H., Doxiadis I.N., Levering W.H.B. et al. HLA-DRB1

- associations in individuals with single and multiple red blood cell antibodies. *Vox Sang* 2013;105(Suppl. 1):236.
31. Brown C.J., Navarrete C.V. Clinical relevance of the HLA system in blood transfusion. *Vox Sang* 2011; 101(2):93–105.
32. Головкина Л.Л. Антигены тромбоцитов и их значение в медицине (обзор литературы). *Гематол и трансфузиол* 2010;4:24–31.
33. Newman P.J., Derbes R.S., Aster R.H. The human alloantigens, P1^{A1} and P1^{A2}, are associated with a leucine³³/proline³³ amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989;83:1778.
34. Bowditch R.D., Tani P.H., Halloran C.E. et al. Localization of a P1^{A1} epitope to the amino terminal 66 residues of platelet glycoprotein IIIa. *Blood* 1992;79(3):559–62.
35. Honda S., Honda Y., Bauer B. et al. The impact of three-dimensional structure on the expression of P1^A alloantigen on human integrin β_3 . *Blood* 1995;86(1):234–42.
36. Wu S., Maslanska K., Gorski J. An integrin polymorphism that defines reactivity with alloantibodies generates an anchor for MHC class II peptide binding: a model for unidirectional alloimmune responses. A model for unidirectional alloimmune responses. *J Immunology* 1997;158(7):3221–6.
37. Hammer J., Valsasini P., Tolba K. et al. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 1993;74:197.
38. Maslanka K., Yassai M., Gorski J. Molecular identification of T cells that respond in a primary bulk culture to a peptide derived from a platelet glycoprotein implicated in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1996;98:1802.
39. De Magistris M.T., Alexander M., Coggeshall M. et al. Analog Ag/MHC complex act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 1992;68:625–34.
40. Головкина Л.Л., Кутына Р.М., Красникова Н.А. и др. Генетическая предрасположенность к антителообразованию у больных заболеваниями системы крови при компонентной терапии тромбоцитами. Новое в гематол и трансфузиол. Киев, Ивано-Франковск, 2008. Вып. 8. С. 104–112.
41. Golovkina L.L., Atroshchenko G.V., Pushkina T.D. The restriction HLA-DR, -DQ molecules in high platelet transfused patients with hematological disorders. *Vox Sang* 2011;101 supplement 1 (Abstracts of the 21st Regional Congress of the ISBT, Lisbon, Portugal). Poster 663.
42. L'Abbe D., Tremblay L., Filion M. et al. Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (PIA1) is strongly associated with both HLA-DRB3*0101 and HLA-DQB1*0201. *Hum Immunol* 1992;34(2):107–14.
43. Semana G., Zazoun T., Alizadeh M. et al. Genetic susceptibility and anti-human platelet antigen 5b alloimmunization role of HLA class II and TAP genes. *Human Immunol* 1996;46(2):114–9.
44. Westman P., Hashemi-Tavoularis S., Blanchette V. et al. Maternal DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602 haplotype in fetomaternal alloimmunization against human platelet alloantigen HPA-6b (GPIIIa-Gln489). *Tissue Antigens* 1997;50(2):113–8.
45. Blanchette V.S., Johnson J., Rand M. The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:365–90.
46. Ohto H., Miura S., Ariga H. et al. The natural history of maternal immunization against fetal platelet alloantigen. *Transfus Med* 2004;14:399–408.
47. Rayment R., Kooij T.W., Zhang W. et al. Evidence for the specificity for platelet HPA-1a alloepitope and the presenting HLA-DR52a of diverse antigen-specific helper T cell clones from alloimmunized mothers. *J Immunol* 2009;183:677–86.
48. Sarab G.A., Moss M., Barker R.N., Urbaniak S.J. Naturally processed peptides spanning the HPA-1a polymorphism are efficiently generated and displayed from platelet glycoprotein by HLA-DRB3*0101-positive antigen-presenting cells. *Blood* 2009;114(9):1954–7.
49. Ahlen M.T., Husebekk A., Killie M.K. et al. T cell responses associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia: Isolation of HPA-1a-specific, HLA-DRB3*0101-restricted CD4⁺ T cells. *Blood* 2009;113(16):3838–44.
50. Sukati H., Bessos H., Barker R.N., Urbaniak S.J. Characterization of the alloreactive helper T-cell response to the platelet membrane glycoprotein IIIa (integrin- β_3) in human platelet antigen-1a alloimmunized human platelet antigen-1b1b women. *Transfusion* 2005;45(7):1165–77.
51. Jackson D.J., Murphy M.F., Soothill P.W. et al. Reactivity of T cells from women with antibodies to the human platelet antigen (HPA)-1a to peptides encompassing the HPA-1 polymorphism. *Clin Exp Immunol* 2005;142(1):92–102.
52. Kaplan C., Porcelijn L., Vanlieferinghen P. et al. Anti-HPA-9bw (Maxa) fetomaternal alloimmunization, a clinically severe neonatal thrombocytopenia: difficulties in diagnosis and therapy and report on eight families. *Transfusion* 2005; 45(11):1799–803.
53. Moncharmont P., Courvoisier S., Pagnier A. et al. Severe HPA-15b related neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Acta Paediatrica* 2007;96:1701–6.
54. Fuller T.C., Fuller A. The humoral immune response against an HLA class I allodeterminant correlates with the HLA-DR phenotype of the responder. *Transplantation* 1999;68(2):173–82.
55. Heise E., Manning C., Thacker L. HLA phenotypes of ESRD patients are risk factors in the panel-reactive antibody (PRA) response. *Clin Transplant* 2001;15(Suppl 6):22–7.
56. Papassavas A.C., Barnardo M.C., Bunce M., Welsh K.I. Is there MHC Class II restriction of the response to MHC Class I in transplant patients? *Transplantation* 2002;73(4):642–51.
57. Dankers M.K., Roelen D.L., Nagelkerke N.J. et al. The HLA-DR phenotype of the responder is predictive of humoral response against HLA class I antigens. *Human Immunol* 2004; 65(1):13–9.

ОТ РЕДАКЦИИ / FROM EDITION



Журнал начинает серию публикаций о физиологии гемопозитической системы с обзора, посвященного ультраструктуре и функции тромбоцитов – удивительных биологических образований, о которых до недавнего времени было известно очень мало. Исследования последних десятилетий выявляют все новые свойства этих странных безъядерных клеточных фрагментов. Безусловно, очевидна центральная роль тромбоцитов в процессах гемостаза, притом что детали и глубинные составляющие сложных многофакторных событий, происходящих постоянно на этом пути, исследованы пока очень поверхностно. Не говоря уже об участии тромбоцитов в онкогенезе или в развитии аутоиммунных заболеваний. Пока что такая информация доступна в основном биологам, в то время как для практической клинической медицины современные представления о тромбоцитах все еще малоизвестны.

Надеемся, что представленная в данной рубрике публикация, посвященная обсуждаемой тематике, сможет помочь лучше понимать, диагностировать, а затем и лечить заболевания, центральными участниками которых являются эти все еще таинственные безъядерные клеточные образования.

Тромбоциты и гемостаз

М.А. Пантелеев¹⁻⁵, А.Н. Свешникова¹⁻³

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва;

²ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

³физический факультет ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

⁴ФГБУ ГНЦ Минздрава России, Москва;

⁵ООО «ГемаКор», Москва

Контакты: Михаил Александрович Пантелеев mapanteleev@yandex.ru

Тромбоциты представляют собой безъядерные клеточные фрагменты, играющие важную роль в гемостазе, остановке кровотечения при повреждении, а также в патологическом тромбообразовании. Главным способом выполнения своей функции у тромбоцитов является формирование агрегатов, перекрывающих место повреждения. Способность к агрегации они получают в результате переходного процесса, называемого активацией. Несмотря на относительно простую и однозначную функцию, устройство тромбоцитов весьма сложно: они имеют почти полноценный набор органелл, включая эндоплазматический ретикулум, митохондрии и другие образования; при активации тромбоциты секретируют разнообразные гранулы и вступают во взаимодействия с белками плазмы и клеток крови и других тканей; сама их активация управляется многочисленными рецепторами и сложными сигнальными каскадами. В настоящем обзоре мы рассмотрим устройство тромбоцита, механизмы его функционирования в норме и патологии, методы диагностики нарушений функции тромбоцитов и подходы к их коррекции. Особое внимание будет уделено тем областям науки о тромбоцитах, где до сих пор таятся загадки.

Ключевые слова: структура тромбоцитов, функция тромбоцитов

Platelets and hemostasis

M.A. Panteleev¹⁻⁵, A.N. Sveshnikova¹⁻³

¹Theoretical Problems Center of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow;

²Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow;

³Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow;

⁴Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow;

⁵HemaCore Company, Moscow

Platelets are anuclear cell fragments playing important role in hemostasis, termination of bleeding after damage, as well as in pathological thrombus formation. The main action of platelets is the formation of aggregates, overlapping the injury. They obtained the ability to aggregate by the transition process called activation. Despite the relatively simple and definite function platelet structure is very difficult: they have almost a full set of organelles, including the endoplasmic reticulum, mitochondria and other entities. When activated platelets secrete various granules interact with plasma proteins and red blood cells and other tissues. Their activation is controlled by multiple receptors and complex signaling cascades. In this review platelet structure, mechanisms of its functioning in health and disease, diagnostic methods of platelet function and approaches to their correction were considered. Particular attention will be given to those areas of the science of platelets, which still lay hidden mysteries.

Key words: platelet structure, platelet function

Введение

Тромбоциты представляют собой маленькие, 2–4 микрометра диаметром, безъядерные клеточные фрагменты (хотя иногда их называют клетками), циркулирующие в кровотоке в концентрации 200–400 тыс. на микролитр и отвечающие за ключевые этапы процесса остановки кровотечения — гемостаза. В случае ранения они способны прикрепляться к поврежденным тканям и друг к другу, формируя тромбоцитарную пробку-агрегат (рис. 1), прекращающую потерю крови и препятствующую попаданию микробов в систему кровообращения. Это не единственный механизм гемостаза, но крайне важный. Наследственные и приобретенные нарушения функции тромбоцитов, такие

как тромбастения Гланцмана или иммунная тромбоцитопения, являются тяжелыми заболеваниями, для которых характерны опасные кровотечения. Тромбоциты принимают активное участие и в других составляющих механизма гемостаза: одни секретируемые ими вещества вызывают локальную вазоконстрикцию, а другие — ускоряют реакции свертывания крови.

С другой стороны, избыточная функция или количество тромбоцитов, или иные нарушения в сердечно-сосудистой системе могут приводить к формированию тромбоцитарных агрегатов не вне, а внутри сосуда — тромбов (рис. 2). Тромбоцитарные тромбы могут образовываться в самых разных ситуациях и играют центральную роль в таких патологических состо-

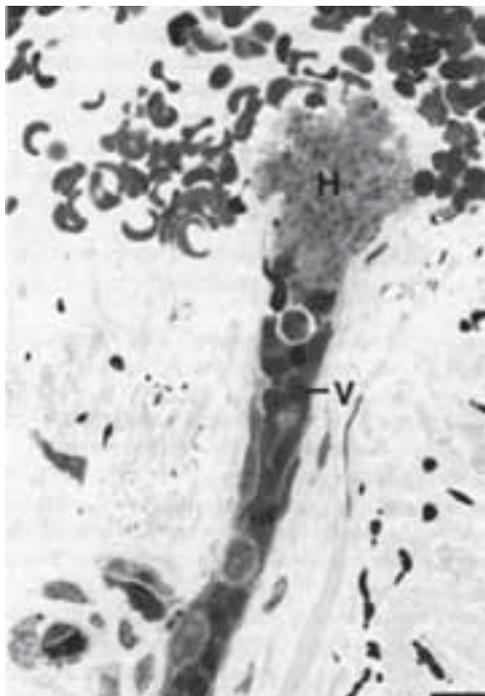


Рис. 1. Гемостатический агрегат, формируемый тромбоцитами в артериоле собаки. Наблюдаемая под световым микроскопом картина тромбоцитарной пробки (H), перекрывающая разорванный сосуд (V). Биопсия произведена через 3 мин после ранения. Многочисленные эритроциты в верхней части снимка располагаются в просвете раны, тянущейся слева направо. Шкала размера в правом нижнем углу соответствует 10 микрометрам. Воспроизведено из [1]

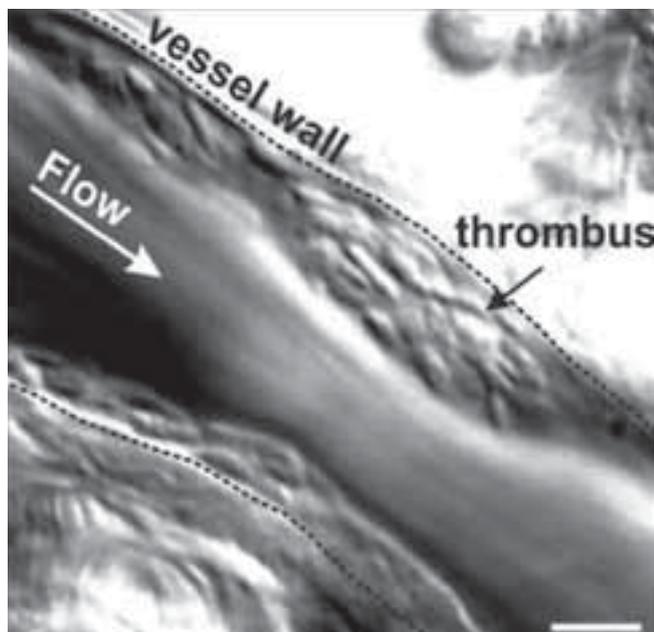


Рис. 2. Формирование тромба в артериоле. Интравитальная ДИК-микроскопия тромбообразования в сосуде крысы, поврежденном посредством фотоактивации красителя бенгальский розовый. Тромб на сосудистой стенке, покрывающий место повреждения, указан в правой верхней части снимка. В нем можно различить отдельные тромбоциты и заметить, что они сохраняют дисковидную форму на первых этапах прикрепления. Направление потока указано стрелкой. Шкала масштаба соответствует 5 микрометрам. Воспроизведено из [2]

ниях, как инфаркты и инсульты. Таким образом, они отвечают за львиную долю смертности и инвалидности в современном мире, а противотромбоцитарные препараты, такие как клопидогрел, занимают почетные места в списке наиболее продаваемых лекарств на планете.

Тромбоциты во многих отношениях устроены просто: у них нет ядра, нет или практически нет синтеза белка, они не могут расти или делиться. Задача тромбоцита – приклеиться к месту повреждения – тоже выглядит простой и однозначной по сравнению с задачами практически любой иной клетки. Но на практике оказывается, что эта простота обманчива. Для выполнения своей функции они должны активироваться в процессе, который управляется добрым десятком активаторов, действующих через многочисленные рецепторы. Сеть сигнальных путей в тромбоците, управляющих его ответом, является сложной и плохо изученной. Сам по себе ответ тромбоцита представляет собой не простое «приклеивание», а включает десятки функций, начиная от первичной адгезии и заканчивая везикуляцией.

Кроме фундаментальных сложностей, тромбоциты таят в себе немало практических загадок: в настоящий момент в руках врачей нет ни сколько-нибудь адекватного теста для оценки функции тромбоцитов, ни действенного инструмента ее улучшения. Несмотря на огромный прогресс, достигнутый в конце XX века в связи с разработкой лекарственных препаратов-антагонистов гликопротеина IIb-IIIa и рецептора P2Y₁₂, подавление активности тромбоцитов в целях борьбы с тромбозами все еще не является решенной проблемой. Наконец, сейчас разворачивается интенсивное исследование роли тромбоцитов за пределами гемостаза – в ангиогенезе, иммунитете и других системах.

Как клинические, так и биологические исследования тромбоцитов привлекают огромный интерес специалистов во всем мире. Практически каждый год приносит нам новые открытия, и представления о важнейших процессах буквально за последние годы претерпели радикальные изменения. В настоящем обзоре мы постараемся сосредоточиться на фундаментальных представлениях о тромбоците и рассказать о последних достижениях в понимании его функционирования. Тем, кто желает ближе познакомиться с разными аспектами жизни этой удивительной клетки, можно порекомендовать основополагающий учебник А.В. Мазурова [3]. Владеющие английским языком найдут ценную информацию в учебнике-справочнике Platelets под редакцией Алана Майкельсона [4], который регулярно переиздается.

Строение тромбоцита

В исходном, неактивированном виде тромбоциты напоминают двояковыпуклые «тарелочки» (рис. 3, слева). Благодаря своему маленькому размеру (2–4 микрона в диаметре) они свободно проходят через капилляры,

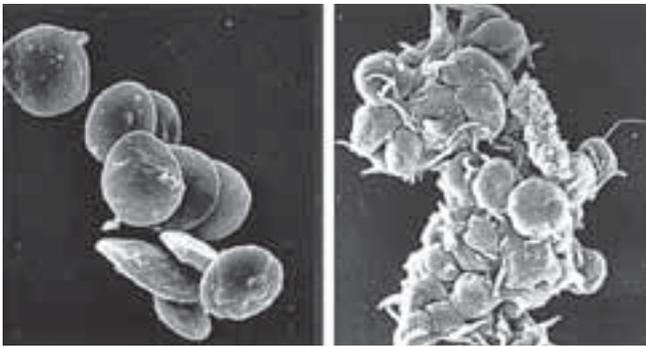


Рис. 3. Тромбоциты. Электронная микрофотография неактивированных тромбоцитов, сохраняющих дисковидную форму (слева), и активированных АДФ тромбоцитов в агрегате (справа). Воспроизведено из [5]

так что их форма постоянна, в отличие от вынужденных протискиваться через капилляры эритроцитов. Только при активации форма тромбоцита меняется, становясь в большинстве случаев амёбовидной (рис. 3, справа). Форма тромбоцита поддерживается как спектриновым цитоскелетом, придающим их оболочке упругость, так и кольцом из тубулиновых микротрубочек (рис. 4), которое разрушается при активации. Цитоплазма клетки содержит многочисленные гранулы, главными из которых являются плотные гранулы, содержащие преимущественно низкомолекулярные вещества, такие как серотонин и аденозиндифосфат (АДФ), и альфа-гранулы, содержащие белки – фибриноген, тромбоспондин, Р-селектин, фактор свертывания V, фактор фон Виллебранда и многие другие [8]. Содержимое этих гранул секретируется при актива-

ции. Важно отметить, что форма тромбоцита во многих отношениях является иллюзорной. Его внутренняя среда на самом деле представляет собой сплошную «губку», сеть мембранных каналов, которая служит дополнительным источником мембранной поверхности при активации и способствует секреции гранул [7].

Способность к активации – быстрому и в большинстве случаев необратимому переходу в некое новое состояние – является главным качеством тромбоцита. Стимулом активации может служить практически любое значительное возмущение окружающей среды, вплоть до простого механического напряжения. Однако основными физиологическими активаторами тромбоцитов считаются: 1) коллаген – главный белок внеклеточного матрикса; 2) тромбин – сериновая протеиназа, центральный фермент плазменной системы свертывания; 3) АДФ – адениновый нуклеотид, который выделяется из разрушенных клеток сосуда или секретируется плотными гранулами самих тромбоцитов; 4) тромбоксан А2 – липид из класса эйкозаноидов, синтезируемый и выделяемый тромбоцитами.

Действие каждого из тромбоцитарных активаторов опосредуется через специализированные рецепторы в мембране тромбоцита. Так, коллаген активирует тромбоциты через гликопротеин VI, тромбин имеет 2 главных протеиназ-активируемых рецептора PAR1 и PAR4, действие АДФ происходит через пуринорецепторы P2Y1 и P2Y12. Стимуляция любого из рецепторов ведет к активации сложной сети каскадов внутриклеточной сигнализации, которые управляют ответом клетки; причем разные рецепторы в целом запускают разные пути.

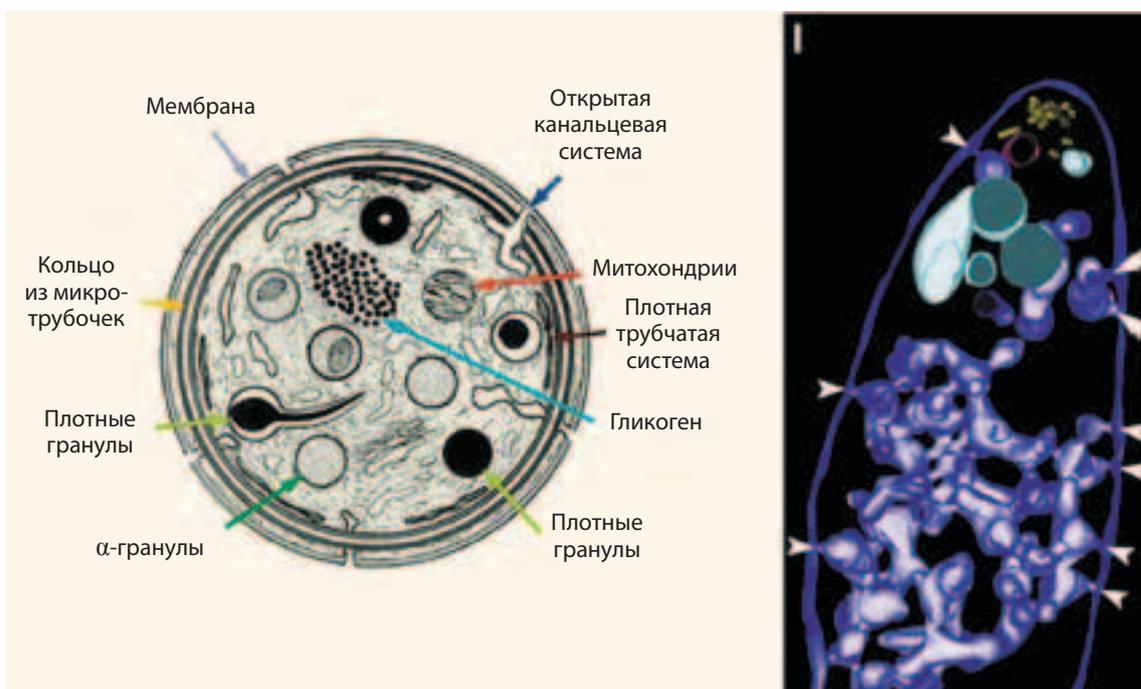


Рис. 4. Структура тромбоцита. На схеме слева можно различить основные элементы структуры тромбоцита, наблюдаемые под электронным микроскопом. Воспроизведено из [6]. Справа показана трехмерная реконструкция внутренностей тромбоцита по данным электронной томографии. Обратите внимание, что показанная синим каналикулярная система занимает огромную долю объема клетки. Воспроизведено из [7]

Активация тромбоцитов внешне проявляется многочисленными внутренними перестройками и изменениями свойств, основными среди которых считаются: 1) изменение формы на амёбовидную, для части тромбоцитов – сферическую [9]; 2) усиление способности к адгезии – прикреплению к месту повреждения [10]; 3) появление способности к агрегации – прикреплению к другим тромбоцитам с целью формирования полноценной пробки; 4) секреция описанных выше многочисленных низко- и высокомолекулярных соединений из плотных гранул, альфа-гранул и других источников; 5) экспонирование прокоагулянтной мембраны.

Часть этих свойств служит для реализации главной функции тромбоцитов – формирования гемостатической пробки, другая – для ускорения реакций свертывания крови. Так, экспонирование прокоагулянтной мембраны и секреция альфа-гранул необходимы для осуществления именно второй функции тромбоцитов.

Свертывание крови представляет собой каскад реакций в плазме крови, который заканчивается формированием сети волокон фибрина и переводом крови из жидкого состояния в желеобразное [11]. Многие ключевые реакции свертывания являются мембранно-зависимыми (рис. 5), ускоряясь на многие порядки в присутствии отрицательно заряженных фосфолипидных мембран, с которыми белки свертывания связываются посредством так называемых кальциевых мостиков. В нормальном состоянии мембрана тромбоцитов не поддерживает реакций свертывания. Отрицательно заряженные фосфолипиды, в первую очередь фосфатидилсерин, сосредоточены на внутреннем

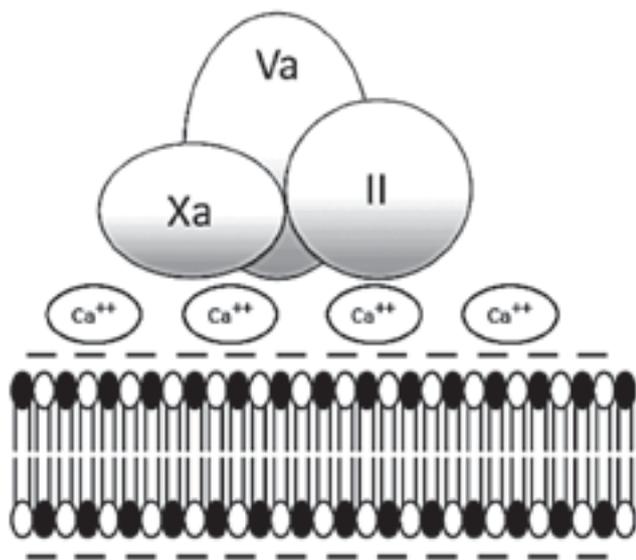


Рис. 5. Мембранные реакции свертывания крови. Активация тромбоцитов ведет к появлению фосфатидилсерина во внешнем слое мембраны тромбоцитов. Факторы свертывания связываются с такими мембранами посредством кальциевых мостиков, формируя комплексы белков, в которых реакции свертывания ускоряются на порядки. На иллюстрации изображен комплекс протромбиназы, состоящий из факторов Xa, Va, II, находящийся на поверхности бислоидной мембраны

слое мембраны, а фосфатидилхолин внешнего слоя связывает факторы свертывания гораздо хуже. Несмотря на то, что некоторые факторы свертывания могут связываться и с неактивированными тромбоцитами, это не приводит к формированию активных ферментативных комплексов.

Активация тромбоцита, предположительно, приводит к активации фермента скрамблазы, который начинает быстро, специфично, двусторонне и АДФ-независимо перебрасывать отрицательно заряженные фосфолипиды из одного слоя в другой. В результате происходит ускоренное установление равновесия, при котором концентрация фосфатидилсерина в обоих слоях становится одинаковой. Кроме того, при активации имеет место экспозиция и/или конформационное изменение многих трансмембранных белков внешнего слоя мембраны, и они приобретают способность специфически связывать факторы свертывания, ускоряя реакции с их участием. Что интересно, только часть тромбоцитов проявляет такие свойства при активации [12–14].

Вообще говоря, активированное состояние тромбоцита может быть разным: активация тромбоцитов имеет несколько степеней, и экспрессия прокоагулянтной поверхности является одной из высших. Только тромбин или коллаген могут вызывать такой сильный ответ. Более слабые активаторы, особенно АДФ, могут вносить вклад в работу сильных активаторов [15]. Однако они не способны самостоятельно вызвать выход фосфатидилсерина на внешний слой мембраны; их эффекты сводятся к изменению формы, агрегации и секреции части гранул.

Как работает тромбоцит

Наиболее распространенным способом тестирования состояния системы тромбоцитарного гемостаза в современной диагностической практике является агрегация, в которой по оптической плотности оценивается эффект добавления к суспензии тромбоцитов некоторого активатора. Активатор, чаще всего АДФ или коллаген, добавляется к обогащенной тромбоцитами плазме крови при постоянном перемешивании на протяжении нескольких минут. Тромбоциты активируются, взаимодействуют друг с другом, и происходит формирование агрегатов, которое можно заметить по уменьшению мутности суспензии, вызванному уменьшением количества рассеивающих свет частиц. Существуют варианты теста агрегации, связанные с иными принципами детекции: например, можно измерить агрегацию тромбоцитов в цельной крови, если использовать импедансный метод вместо оптического.

Возможно, именно в связи с распространенностью теста агрегации за последние десятилетия в умах многих специалистов утвердилось представление, что формирование тромбоцитарного тромба или гемостатической пробки в организме происходит похожим способом: сначала активация (например, выделившимся из кле-

ток поврежденной стенки сосуда АДФ), а потом агрегация. Несмотря на то, что исследование роста тромбоцитарного тромба в проточных камерах имеет историю длиной почти в полвека, только в последние десятилетия этот традиционный взгляд начал подвергаться сомнению [2].

Рассмотрим первую стадию формирования тромба: адгезии тромбоцитов к коллагену, экспонированному в месте повреждения. Попробуем оценить времена и расстояния, типичные для этого процесса. Пусть характерный размер области повреждения будет составлять, скажем, $l = 10$ микрометров (1 оторвавшаяся клетка эндотелия). Пусть скорость потока будет артериальной, это означает градиент скорости потока на стенке около $u = 1000 \text{ с}^{-1}$. Тогда тромбоцит, имеющий характерный размер (по порядку величины) около $x = 1$ микрометра, будет двигаться около стенки со скоростью $v = x \times u = 1000$ микрометров в секунду. Это означает, что он пролетит над местом повреждения за время $l/v = 10$ микросекунд при том, что типичное время активации тромбоцита составляет минуты, для каких-то событий (скажем, активация интегринов) несколько секунд, но никак не одну сотую секунды. Отсюда следует единственный возможный вывод, который к настоящему моменту подкреплен экспериментально [2]: чтобы нормально активироваться, тромбоцит должен сначала прикрепиться к месту повреждения.

Более того, то же самое применимо и к последующим событиям увеличения размера тромба — агрегации. Тромбоцит, проплывающий над растущим в артерии тромбом, должен успеть присоединиться к нему за сотые доли секунды. Поэтому агрегация в организме может идти тоже только одним образом: сначала агрегация, а потом активация.

Еще одна проблема — это перемещение тромбоцита в сосуде поперек потока крови. Если бы тромбоциты были равномерно распределены в крови и спокойно перемещались с ламинарным потоком вдоль сосуда (а при ранении — вдоль раны), каждый по своей линии тока, то они не могли бы подойти к месту повреждения, чтобы выполнить свою задачу в гемостазе: для адгезии к месту повреждения или присоединения к уже активированному тромбоциту в тромбе необходимо воздействие какой-то физической силы, приводящей клетки в контакт. В тестах *in vitro* эта задача выполняется обычно магнитной мешалкой; а что работает в организме?

Вышеописанные рассуждения не могут, разумеется, служить доказательством новой картины тромбоцитарного гемостаза и тромбоза. Эта новая картина, которая будет изложена ниже, сложилась в последние 10 лет в результате активной экспериментальной работы многих исследователей, ведущую роль среди которых играет лаборатория Shaun P. Jackson в Австралии [2, 10]; при этом подавляющее большинство результатов получено с помощью видеомикроскопических

наблюдений за тромбообразованием *in vivo*. Представленные вниманию читателя численные оценки призваны лишь показать нереальность и внутреннюю противоречивость традиционного представления об агрегации тромбоцитов.

Как же происходит формирование тромбоцитарного тромба в реальности?

Первым шагом является вытеснение тромбоцитов к стенкам сосуда, осуществляемое эритроцитами. Красные клетки крови занимают почти половину ее объема, они на порядок превосходят тромбоциты как по концентрации, так и по массе. Столкновения эритроцитов, двигающихся с разными скоростями на разных линиях тока, между собой ведут к их перераспределению и концентрации у оси сосуда. Многие детали этого процесса неясны, но подобные перераспределения наблюдались в суспензиях частиц самого разного типа, не только в крови [16]. Легкие и малочисленные тромбоциты оказываются постоянно вытеснены на периферию, что крайне удобно, так как именно там, около потенциальных мест повреждения, находится их рабочее место; таким образом, локальная концентрация тромбоцитов у стенки сосуда на порядок превышает среднюю по крови.

Более того, даже у стенок сосуда тромбоциты постоянно терпят столкновения с эритроцитами, что ведет фактически к тому самому перемешиванию, которое необходимо для возникновения взаимодействия [17]. Благодаря таким столкновениям тромбоциты часто прижимаются к стенке, и если там оказывается место повреждения, они могут к нему прикрепиться. Помимо 2 главных механизмов, для которых построены надежные теории, — вытеснения и постоянного толкания — сейчас обсуждаются и другие, но бесспорным является экспериментальный факт: присутствие эритроцитов больше чем в 10 раз увеличивает скорость роста тромбоцитарного агрегата на поврежденной поверхности [18].

Второй проблемой является необходимость быстрой и бережной остановки тромбоцита, оказавшегося у места повреждения или около растущего тромба. Чтобы принять участие в формировании гемостатической пробки или тромба, тромбоцит должен погасить свою немалую скорость. Для этого служит специальный рецептор на тромбоцитах, гликопротеин Ib-V-IX, и растворенный в крови фактор фон Виллебранда (рис. 6). Этот фактор, циркулирующий в виде больших мультимеров до 100 нанометров в диаметре, способен обратимо связываться с коллагеном и тромбоцитами в составе тромба, так что он быстро покрывает их. Проносимые мимо тромбоциты цепляются за фактор фон Виллебранда и начинают останавливаться. Если бы они связывали коллаген напрямую, то резкая их остановка могла бы повредить, но слабо привязанный фактор фон Виллебранда может отсоединиться и вновь присоединиться к коллагену, так что тромбоциты могут достаточно быстро ос-

тановиться, проскользив всего несколько своих длин, как самолет, садящийся на брюхо.

Активация в таком подходе оказывается не первой, а последней стадией в формировании тромба. Обратимо связавшийся с местом повреждения тромбоцит может оторваться; однако активация способна его стабилизировать. Тромбоциты первого слоя, севшие непосредственно на коллаген, активируются коллагеном же через рецептор гликопротеин VI и затем прочно связываются с коллагеном через рецептор интегрин $\alpha 2\beta 1$: белки этого семейства способны менять свою конформацию и прочность связывания с мишенью под действием внутриклеточных сигналов (рис. 6). В своем обычном состоянии он не взаимодействует с коллагеном, а при активации крепится к нему прочно.

Прикрепление следующих слоев тромбоцитов, т. е. собственно рост тромба, происходит аналогичным образом: сначала клетки непрочно садятся на фактор фон Виллебранда, а после активации надежно закрепляются через рецепторы-интегрины. Разница заключается в том, что тромбоциты между собой связываются через другой интегрин, называемый $\alpha IIb\beta 3$ (или гликопротеин IIb-IIIa): эти рецепторы «хватают» с 2 сторон молекулы фибриногена и через такие «фибриногеновые мостики» связывают отдельные тромбоциты. Второе отличие заключается в том, что следующие слои тромбоцитов активируются не контактом с коллагеном (который уже закрыт первым слоем), а растворимыми активаторами, которые либо секретируются самими тромбоцитами (АДФ, тромбоксан А₂), либо образуются в ходе работы плазменной системы свертывания (тромбин). Важно подчеркнуть еще раз, что эти активаторы действуют исключительно в пределах тромба: быстрый поток за его пределами уносит их, не давая возможности рекрутировать новые клетки в тромб.

Картина роста тромбоцитарного тромба *in vivo* сейчас достаточно устоялась, и описанная выше последовательность событий считается общепризнанной. Тем не менее в ней хватает неясных мест, которые будут обсуждаться ниже.

Проблемы диагностики функции тромбоцитов

В настоящий момент диагностика функций тромбоцитов не менее чем на 90 % производится с помощью исследования агрегации. Принципы и недостатки этого подхода обсуждались выше; главной проблемой является то, что ни один из тестов агрегации не соответствует тому, что происходит *in vivo*.

Наверное, еще 10 % функциональной оценки обеспечивается проточной цитометрией, которая позволяет определить антигенный состав белков на поверхности тромбоцита. Наиболее подготовленные специалисты могут также использовать цитометрию для более детальной характеристики функций тромбоцитов: активации интегринов, выхода гранул и фосфатидилсерина. Это дает полезную информацию об отдельных молекулах и способностях клетки. Тем не менее все это не дает ответа на общий вопрос: как адекватно оценить функцию тромбоцитов в целом?

Наиболее естественный ответ: надо заставить тромбоциты формировать тромбы в условиях, приближенных к физиологическим. В настоящее время все большее применение набирают проточные камеры [20], в которых адгезия тромбоцитов к покрытой коллагеном подложке изучается с помощью микроскопии. В настоящий момент уже существуют коммерчески доступные камеры и ведется их стандартизация, хотя до сколько-нибудь значимого клинического применения в практике диагностического комплекса еще далеко. Возможным соперником для видеомикроскопии являются похожие подходы, использующиеся

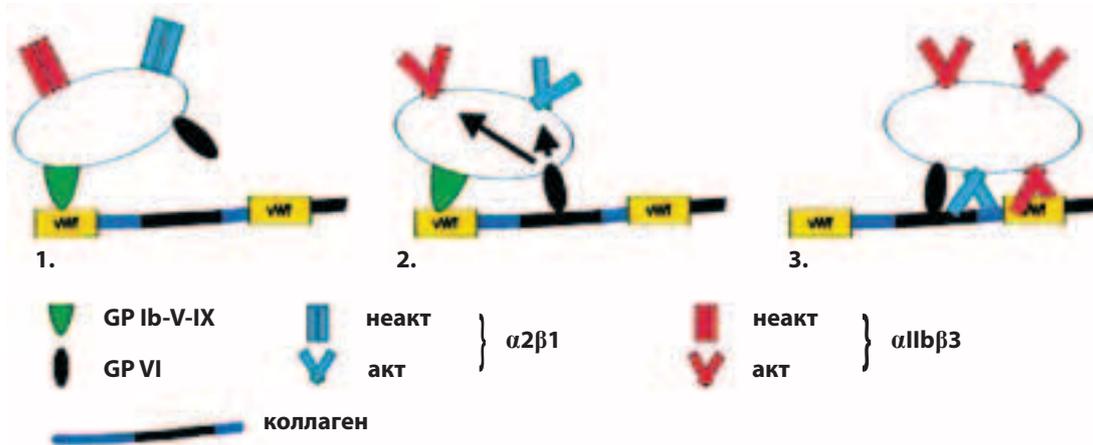


Рис. 6. Основной механизм начального роста тромбоцитарного тромба. Первичное закрепление тромбоцита в месте повреждения происходит путем взаимодействия главного адгезионного рецептора гликопротеина Ib-V-IX с молекулой-посредником фактором фон Виллебранда (vWf), закрепленным на обнажившемся коллагене (шаг 1). Затем сигнальный рецептор гликопротеин VI связывается с коллагеном, что ведет к активации тромбоцитов (шаг 2). Активация агрегационных рецепторов интегринов $\alpha 2\beta 1$ (служит для связывания коллагена) и $\alpha IIb\beta 3$ (для связывания через фибриногеновые мостики с другими тромбоцитами) способствует закреплению активированного тромбоцита на коллагене (шаг 3) и создает основу для дальнейшего роста тромба. Воспроизведено из [19]

в приборах типа PFA [21], где оценивается способность тромбоцитов забивать агрегатами картридж, через который прокачивается цельная кровь.

Проблемы коррекции функции тромбоцитов

Контроль функции тромбоцитов является одним из главных способов борьбы с артериальными тромбозами практически любой природы. Исходно основным препаратом для этой цели был аспирин, блокирующий синтез тромбоксана A2: несмотря на давнюю историю препарата, только во 2-й половине XX века была открыта его способность подавлять тромбообразование и снижать риск инфаркта. В 1990-е годы появились эффективные антиагреганты, атакующие рецептор к фибриногену, интегрин $\alpha IIb\beta 3$: абциксимаб, тирофибан, эптифибатид [22], а также отечественный препарат монафрам. Сейчас оба этих класса препаратов в значительной степени вытесняются ингибиторами аденозиндифосфатного рецептора P2Y12: это в первую очередь клопидогрел, а также прасугрел, тикагрелор и кангрелор [23]. Сейчас активно ведутся работы по созданию новых препаратов, обладающих большей эффективностью и меньшей опасностью кровотечений.

Более сложная задача – как быть, когда тромбоцитов мало или они плохо работают? Технология приготовления и хранения тромбоцитарных концентратов для переливания достигла наилучших результатов к середине 1980-х годов, и принципиальных прорывов с тех пор не произошло. Короткое время жизни, высокий риск иммунных осложнений и инфицирования пациента, непрерывно усугубляющийся во всем мире дефицит доноров, отсутствие вплоть до самого последнего времени искусственных заменителей делают ситуацию с переливанием тромбоцитов крайне неудовлетворительной, возможно, самой проблемной среди всех компонентов крови.

На протяжении все тех же последних десятилетий единственной доступной для клинического использо-

вания альтернативой обычным тромбоконцентратам было криоконсервирование, позволявшее продлить срок их жизни до нескольких лет. Но решить проблему сохранения свойств тромбоцитов при замораживании и размораживании до конца так и не удалось. К тому же замораживание этих клеток оказалось связано с таким количеством технических сложностей, что вплоть до настоящего времени оно не смогло составить успешную конкуренцию использованию незамороженных тромбоконцентратов.

Именно поэтому с каждым годом все большее внимание уделялось начатым еще в 1950-е годы работам по созданию новых препаратов и методов, способных радикально продлить срок жизни и удобство использования донорских тромбоцитов, а то и создать возможные аналоги, позволяющие полностью отказаться от их использования. Антибактериальные препараты и ингибиторы жизнедеятельности тромбоцитов, новые криоконсерванты и протоколы заморозки, лиофилизированные тромбоциты и везикулы на основе тромбоцитарных мембран, эритроциты с гемостатической функцией и липосомы – вот далеко не полный список подходов, применявшихся для достижения этой цели. Некоторые из них – например, лиофилизированные тромбоциты Stasix – уже сейчас находятся в активных клинических исследованиях [24].

Загадки тромбоцитов

Субпопуляции. Одна из наиболее интригующих загадок тромбоцитов – их гетерогенность. При активации тромбоцитов формируются 2 субпопуляции с драматически разными свойствами [25]. Их формирование управляется не до конца исследованными сигнальными путями [13]. Интересно, что одна из этих субпопуляций ускоряет реакции свертывания, а вторая способна к нормальной агрегации (рис. 7). Это разделение 2 главных функций тромбоцитов интригует [14], но объяснений ему пока не предложено.

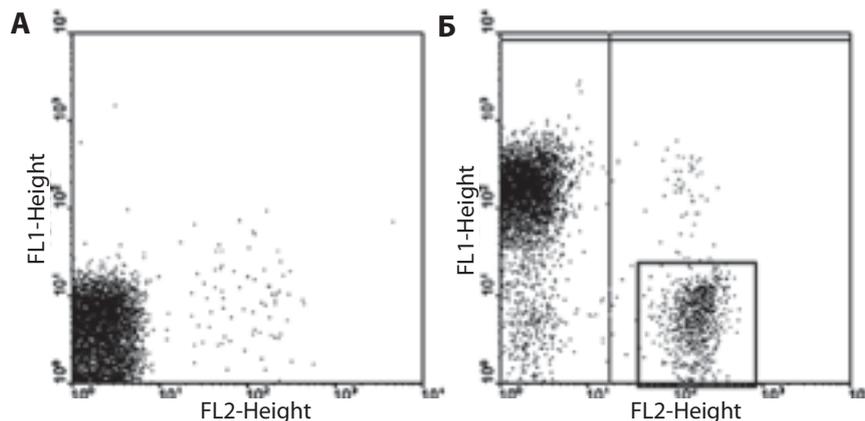


Рис. 7. Субпопуляции тромбоцитов крови радикально различаются по способности к ускорению реакций свертывания и агрегации. Точечные диаграммы суспензии неактивированных (слева) и активированных (справа) тромбоцитов на проточном цитометре. По оси абсцисс отложена флуоресценция аннексина V, маркера фосфатидилсерина. По оси ординат показана флуоресценция фибриногена. Видно, что при активации формируются 2 субпопуляции тромбоцитов, из которых одна на порядки превосходит другую по уровню фосфатидилсерина, но настолько же уступает по связыванию фибриногена. Воспроизведено из [14]

Остановка роста тромба. Выше мы рассмотрели последовательность событий, происходящих в процессе роста тромбоцитарного тромба. Одной из самых больших проблем, которые до сих пор остаются нерешенными, является вопрос об остановке этого роста: почему в каких-то случаях он идет вплоть до полной окклюзии сосуда, а в других сосуд остается свободным? Сейчас существует около десятка гипотез, объясняющих ограниченность размера тромба. Одной из наиболее активно обсуждающихся является предположение о том, что при периодическом разрушении верхней, нестабильной части тромба обнажается сформировавшийся внутри фибрин [26]. Тем не менее этот вопрос еще далек от решения. С большой вероятностью может быть не один механизм остановки, и для разных сосудов эти механизмы могут быть разными.

Тромбоциты и контактный путь. Довольно давно исследователи показали, что тромбоциты потенциально способны активировать свертывание крови по контактному пути [27]. Главными кандидатами на роль активаторов считаются полифосфаты, выходящие из плотных гранул при активации [28], хотя есть опровержения этой точки зрения [29]. По-видимому, благодаря этой активации контактный путь активации свертывания крови важен для роста тромбоцитарного тромба, как было показано в недавних работах [30]. Это открытие позволяет надеяться на создание новых антитромботических препаратов.

Микровезикулы. Тромбоциты при активации отщепляют липидные микрочастицы, также называемые микровезикулами. Рецепторы на их поверхности сконцентрированы, и поэтому эти частицы обладают колоссальной прокоагулянтной активностью: их поверхность в 50–100 раз более активна, чем поверхность активированных тромбоцитов [31]. Зачем тромбоциты это делают — неясно. Однако в крови даже здоровых людей количество таких везикул значительно, и оно достоверно возрастает у пациентов с различными сердечно-сосудистыми и гематологическими заболеваниями, коррелируя с риском тромбозов. Изучение этих

везикул затруднено их крошечными размерами (30–300 нм), намного меньше длины волны света [32].

Тромбоциты в онкологии. Тромбоциты играют двойственную роль при онкологических заболеваниях [33]. С одной стороны, они увеличивают риск и тяжесть венозных тромбозов, характерных для пациентов с опухолями. С другой стороны, они напрямую влияют на течение заболевания, регулируя ангиогенез, рост опухоли и метастазирование с помощью ряда механизмов. Механизмы взаимодействия тромбоцитов с раковыми клетками сложны и плохо изучены, но их исключительная важность сейчас не вызывает сомнения [34].

Заключение

Тромбоциты крови — важнейшие участники как нормального гемостаза, так и патологического тромбоцитарного процесса, состояние которых критично для самых разных заболеваний и состояний. В настоящий момент достигнут существенный прогресс на пути к пониманию функционирования тромбоцитов и коррекции тромбоцитарного гемостаза, но количество научных загадок еще очень велико: взаимодействие тромбоцитов с плазменным гемостазом, сложность сигнализации, механизмы регуляции роста и остановки тромбоцитарного тромба. В последнее время появляются сведения о взаимодействии тромбоцитов с другими системами организма, указывающие на их важные роли в иммунитете и морфогенезе. Главными среди практических сложностей являются отсутствие адекватных интегральных тестов функции тромбоцита и затруднительность нормализации этой функции.

Благодарности

Работа авторов поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 14-04-00670, а также грантами Программ фундаментальных исследований Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

ЛИТЕРАТУРА

1. Sixma J.J., van den Berg A. The haemostatic plug in haemophilia A: a morphological study of haemostatic plug formation in bleeding time skin wounds of patients with severe haemophilia A. *Br J Haematol* 1984;58(4):741–53.
2. Maxwell M.J., Westein E., Nesbitt W.S. et al. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* 2007;109(2):566–76.
3. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 480 с.
4. Michelson A.D. Platelets. 3rd ed., 2013. London; Waltham, MA: Academic Press, xlv, 1353 p.
5. Ohlmann P., Eckly A., Freund M. et al. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of Galphaq. *Blood* 2000;96(6):2134–9.
6. White J.G. Electron microscopy methods for studying platelet structure and function. *Methods Mol Biol* 2004;272:47–63.
7. van Nispen tot Pannerden H., de Haas F., Geerts W. et al. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* 2010;116(7):1147–56.
8. Blair P., Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009;23(4):177–89.
9. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N. et al. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered «cap» on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem* 2013;288(41):29621–32.
10. Kaplan Z.S., Jackson S.P. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology*

- Am Soc Hematol Educ Program 2011;2011:51–61.
11. Tanaka K.A., Key N.S., Levy J.H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 2009;108(5):1433–46.
 12. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J. et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost* 2005;3(11):2545–53.
 13. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S. A., Pantelev M.A. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. *Br J Haematol* 2012;157(1):105–15.
 14. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N. et al. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J* 2012;102(10):2261–9.
 15. Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. *J Thromb Haemost* 2008;6(9):1603–5.
 16. Uijttewaal W.S., Nijhof E.J., Bronkhorst P.J. et al. Near-wall excess of platelets induced by lateral migration of erythrocytes in flowing blood. *Am J Physiol* 1993;264(4 Pt 2):H1239–44.
 17. Tokarev A.A., Butylin A.A., Ataulakhanov F.I. Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. *Biophys J* 2011;100(4):799–808.
 18. Turitto V.T., Weiss H.J. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science* 1980;207(4430):541–3.
 19. Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W. et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001;20(9):2120–30.
 20. Westein E., de Witt S., Lamers M. et al. Monitoring *in vitro* thrombus formation with novel microfluidic devices. *Platelets* 2012;23(7):501–9.
 21. Favalaro E.J., Bonar R. External quality assessment/proficiency testing and internal quality control for the PFA-100 and PFA-200: an update. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(2):239–53.
 22. Kristensen S.D., Würtz M., Grove E.L. et al., Contemporary use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Thromb Haemost* 2012;107(2):215–24.
 23. Ferri N., Corsini A., Bellosta S. Pharmacology of the new P2Y12 receptor inhibitors: insights on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drugs* 2013;73(15):1681–709.
 24. Bode A.P., Fischer T.H. Lyophilized platelets: fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007;35(1):125–33.
 25. Heemskerk J.W., Mattheij N.J., Cosemans J.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 2013;11(1):2–16.
 26. Tosenberger A., Ataulakhanov F., Bessonov N. et al. Modelling of thrombus growth in flow with a DPD-PDE method. *J Theor Biol* 2013;337:30–41.
 27. Bäck J., Sanchez J., Elgue G. et al. Activated human platelets induce factor XIIa-mediated contact activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):11–7.
 28. Müller F., Mutch N.J., Schenk W.A. et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators *in vivo*. *Cell* 2009;139(6):1143–56.
 29. Faxälv L., Boknäs N., Ström J.O. et al. Putting polyphosphates to the test: evidence against platelet-induced activation of factor XII. *Blood* 2013;122(23):3818–24.
 30. Hagedorn I., Schmidbauer S., Pleines I. et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation* 2010;121(13):1510–7.
 31. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y. et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007;97(3):425–34.
 32. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From «platelet dust» to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ* 2013;3(2):329–40.
 33. Riedl J., Pabinger I., Ay C. Platelets in cancer and thrombosis. *Hamostaseologie* 2014;34(1):54–62.
 34. Sharma D., Brummel-Ziedins K.E., Bouchard B.A., Holmes C.E. Platelets in tumor progression: a host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. *J Cell Physiol* 2014;229(8):1005–15.



Базель, 23 мая 2014 г.

Европейский комитет по лекарственным препаратам для человека (CHMP) рекомендует утвердить в ЕС препарат Газива компании Рош для пациентов с хроническим лимфолейкозом

По результатам базового исследования III фазы CLL11 было продемонстрировано, что при использовании препарата Газива (обинутузумаб) в комбинации с хлорамбуцилом достигается значимое снижение риска прогрессирования заболевания или смерти на 86 % и увеличивается общая выживаемость у пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), ранее не получавших лечения, по сравнению с режимом монотерапии хлорамбуцилом.

В сравнении с комбинацией Мабтера + хлорамбуцил применение комбинации Газива + хлорамбуцил позволило значительно снизить риск прогрессирования заболевания или смерти на 61 %.

Компания Рош (SIX: RO, ROG; OTCQX: RHHBY) объявила о том, что Европейский комитет по лекарственным препаратам для человека (CHMP) рекомендовал Европейской комиссии зарегистрировать препарат Газива (обинутузумаб, известный в странах ЕС как Газиваро) в комбинации с хлорамбуцилом для лечения взрослых пациентов с ХЛЛ, ранее не получавших лечения и имеющих сопутствующие заболевания, которые не позволяют провести агрессивную стандартную химиотерапию с применением флударабина в полных дозах.

«Мы воодушевлены тем, что CHMP признал убедительность данных по Газиве, полученных в ходе исследования CLL11, — сказала Сандра Хорнинг, доктор медицины, главный медицинский директор и глава глобального подразделения по разработке лекарственных препаратов компании Рош. — Как правило, примерно у половины пациентов с диагнозом «хронический лимфолейкоз» имеются сопутствующие заболевания, исключающие проведение терапии флударабином в полных дозах. Мы рады, что сделан еще один шаг навстречу тому времени, когда препарат Газива станет доступен для пациентов в качестве инновационной основополагающей терапии их заболевания». Мнение CHMP основывается в первую очередь на результатах исследования III фазы CLL11, которое проводилось в тесном сотрудничестве с немецкой группой по изучению ХЛЛ. Исследование достигло своей пер-

вичной конечной точки и продемонстрировало, что при применении комбинации Газивы с хлорамбуцилом значимо увеличивается выживаемость без прогрессирования заболевания (ВБП) в сравнении с монотерапией хлорамбуцилом и комбинацией Мабтеры (ритуксимаб) с хлорамбуцилом, а также было достигнуто увеличение числа полных молекулярных ремиссий по оценкам минимальной остаточной болезни. При применении препарата Газива с хлорамбуцилом также увеличился показатель общей выживаемости у ранее не получавших лечения пациентов с ХЛЛ по сравнению с теми, кто получал только хлорамбуцил. Результаты исследования были недавно опубликованы в *New England Journal of Medicine*¹. В течение ближайших месяцев в Рош ожидают окончательного решения Европейской комиссии.

О хроническом лимфолейкозе

ХЛЛ является наиболее распространенным видом лейкоза среди населения Западного полушария. В Европе от ХЛЛ умирает примерно 10 тыс. человек ежегодно^{2,3}.

О препарате Газива

Препарат Газива представляет собой новое моноклональное антитело, которое воздействует на антиген CD20 — белок, находящийся на поверхности В-клеток. Данное антитело атакует клетки-мишени как непосредственно, так и вместе с иммунной системой организма. Препарат Газива был открыт в Roche Glycart AG, в настоящее время это Инновационный центр Рош в Цюрихе, входящий в корпоративную организацию по фармацевтическим исследованиям и ранним этапам разработки (Pharma Research and Early Development). В ноябре 2013 г. в США было разрешено применение препарата Газива в комбинации с хлорамбуцилом для лечения пациентов с ХЛЛ, ранее не получавших лечения. Препарат Газива также изучался в ходе обширной клинической программы во всем мире, включая многочисленные исследования III фазы по прямому

сравнению с Мабтерой при индолентных неходжкинских лимфомах и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме.

Об исследовании CLL11

CLL11 – это международное многоцентровое рандомизированное трехгрупповое клиническое исследование III фазы по изучению профиля безопасности и эффективности препарата Газива в комбинации с хлорамбуцилом в сравнении с Мабтерой в комбинации с хлорамбуцилом или монотерапией хлорамбуцилом. В исследование были включены больные ХЛЛ и сопутствующей патологией, ранее не получавшие лечения, в общей сложности 781 пациент. Исследование проводится в тесном сотрудничестве с Немецкой группой по изучению ХЛЛ (DCLLSG). На первом этапе ($n = 589$) сравнивалась комбинация препарата Газива + хлорамбуцил с монотерапией хлорамбуцилом и комбинация Мабтеры и хлорамбуцила с монотерапией хлорамбуцилом. На втором этапе ($n = 663$) проводилось прямое сравнение комбинаций Газивы с хлорамбуцилом и Мабтеры с хлорамбуцилом. Первичным конечным показателем этого исследования является ВВП, вторичными конечными показателями – общая частота ответа, общая выживаемость, выживаемость без признаков заболевания, частота молекулярных ремиссий и профиль безопасности.

Рош в гематологии

Более 20 лет компания Рош занимается разработкой инновационных лекарственных препаратов, которые обеспечивают значительный прогресс в лечении онкогематологических заболеваний. В настоящее время компания Рош прикладывает большие усилия и направляет инвестиции в разработку инновационных способов лечения пациентов, страдающих онкогематологическими заболеваниями. Кроме Мабтеры и Газивы, портфолио потенциальных лекарственных препаратов для лечения онкогематологических заболеваний компании Рош включает в себя 2 конъюгата антитело-лекарство – анти-CD79b (RG7596 / полатумаб ведотин), малую молекулу – антагонист MDM2

(RG7112), а также разработанную в сотрудничестве с компанией AbbVie малую молекулу – ингибитор BCL-2 (RG7601/GDC-0199/ABT-199).

О компании Рош

Компания Рош входит в число ведущих компаний мира в области фармацевтики и является лидером в области диагностики *in vitro* и гистологической диагностики онкологических заболеваний. Стратегия, направленная на развитие персонализированной медицины, позволяет компании Рош производить инновационные препараты и современные средства диагностики, которые спасают жизнь пациентам, значительно продлевают и улучшают качество их жизни. Являясь одним из ведущих производителей биотехнологических лекарственных препаратов, направленных на лечение онкологических, офтальмологических и аутоиммунных заболеваний, тяжелых вирусных инфекций, нарушений центральной нервной системы, и пионером в области самоконтроля сахарного диабета, компания уделяет особое внимание вопросам сочетания эффективности своих препаратов и средств диагностики с удобством и безопасностью их использования для пациентов.

Компания была основана в 1896 г. в Базеле (Швейцария) и на протяжении уже более 100 лет вносит значительный вклад в мировое здравоохранение. Двадцать четыре препарата Рош, в том числе жизненно важные антибиотики, противомаларийные и химиотерапевтические препараты, включены в Перечень основных лекарственных средств ВОЗ. В 2013 г. штат сотрудников группы компаний Рош составил более 85 тыс. человек, инвестиции в исследования и разработки 8,7 млрд швейцарских франков, а объем продаж составил 46,8 млрд швейцарских франков. Компании Рош полностью принадлежит компания Genentech (США) и контрольный пакет акций компании Chugai Pharmaceutical (Япония). Дополнительную информацию о компании Рош в России можно получить на сайте www.roche.ru.

Все товарные знаки, использованные или упомянутые в данном пресс-релизе, защищены законом.

Ссылки

- [1] Goede V, Fischer K., Busch R. et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. N Engl J Med 2014 Mar 20;370(12):1101–10. doi: 10.1056/NEJMoa1313984.
- [2] Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer 2013 Apr;49(6):1374–403. doi: 10.1016/j.ejca. 2012.12.027.
- [3] American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2014. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acs-pc-042151.pdf>.



www.kazan2014.com

VIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ

Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в VIII Съезде онкологов и радиологов стран СНГ, который состоится 16–18 сентября 2014 г. в Казани.

Место проведения: Российская Федерация, Республика Татарстан, г. Казань. Гостиничный торгово-развлекательный комплекс (ГТРК) «Корстон-Казань»

Президент съезда: Президент Правления Общероссийского союза общественных объединений «Ассоциация онкологов России»; главный онколог РФ, директор ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН; президент Ассоциации директоров центров и институтов онкологии, радиологии и рентгенологии государств – участников Содружества Независимых Государств, академик РАН и РАМН, профессор **М.И. Давыдов**



Председатель съезда: главный онколог Приволжского федерального округа и Республики Татарстан, главный врач ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ Республики Татарстан», директор Приволжского филиала ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, президент Ассоциации онкологических учреждений ПФО, профессор **Р.Ш. Хасанов**



- В работе съезда примут участие ведущие специалисты из России, стран СНГ, ближнего и дальнего зарубежья.
- В рамках съезда планируется проведение конкурса молодых ученых.

**16–18 сентября
2014 г., Казань**



ВАЖНАЯ ДАТА:

Прием заявок для конкурса «ЗдравоПисание» – **до 15 августа 2014 г.**

Для клинических ординаторов, аспирантов и студентов медвузов участие в Съезде – **бесплатное**

Технический организатор – Агентство «АБВ-экспо», тел./факс: +7 (495) 988-8992, моб.: +7 (962) 954-0119, info@abvexpo.ru, www.abvexpo.ru

ОСНОВНАЯ КОНЦЕПЦИЯ СЪЕЗДА:

Мультидисциплинарный подход в диагностике, лечении и реабилитации больных со злокачественными новообразованиями

ТЕПЕРЬ ВЫ МОЖЕТЕ СДЕЛАТЬ БОЛЬШЕ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ХМЛ!

СПРАЙСЕЛ® в дозе 100 мг *:

- достижение более быстрого и глубокого ответа, чем на иматинибе ¹
- благоприятный профиль безопасности при длительном применении ^{1,2}
- удобство однократного приема и приверженность пациентов лечению ^{2,3}

СПРАЙСЕЛ®

ПРЕВОСХОДСТВО В ЭФФЕКТИВНОСТИ с самого начала!

1-я линия терапии ХМЛ в ХФ

* по сравнению с иматинибом 400 мг 1 раз в сутки

1. Jorge E. Cortes, MD1, Andreas Hochhaus, MD2, Dong-Wook Kim et al. ASH 2013, abstr. 653

2. Shah N et al. ASCO 2012; Abstr. 6506;

3. Спрайсел®. Инструкции по медицинскому применению: ноябрь 2013; январь 2014

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:³

- Впервые выявленный хронический миелолейкоз в хронической фазе;
- Хронический миелолейкоз в хронической фазе, фазе акселерации или фазе миелоидного или лимфоидного бластного криза при резистентности или непереносимости предыдущей терапии, включая иматиниб;
- Острый лимфобластный лейкоз с положительной филадельфийской хромосомой при резистентности или непереносимости предыдущей терапии.

 Bristol-Myers Squibb

Россия, 105064, Москва, ул. Земляной Вал, д. 9
Тел.: +7 (495) 755-92-67, факс: +7 (495) 755-92-62

SPRYCEL®
dasatinib

ТЕРАПИЯ ВЫСОКИХ ДОСТИЖЕНИЙ



Показания. *Неходжкинская лимфома* Рецидивирующая или химиоустойчивая В-клеточная, CD20-положительная неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности или фолликулярная. Фолликулярная лимфома III-IV стадии в комбинации с химиотерапией у ранее нелеченных пациентов. Фолликулярная лимфома в качестве поддерживающей терапии после ответа на индукционную терапию. CD20-положительная диффузная В-крупноклеточная неходжкинская лимфома в комбинации с химиотерапией по схеме СНОР. *Хронический лимфолейкоз* в комбинации с химиотерапией у пациентов, ранее не получавших стандартную терапию. Рецидивирующий или химиоустойчивый хронический лимфолейкоз в комбинации с химиотерапией. *Ревматоидный артрит* (активная форма) у взрослых в комбинации с метотрексатом при непереносимости или неадекватной ответе на текущие режимы терапии, включающие один или более ингибиторов фактора некроза опухолей (ФНО-α). Безопасность и эффективность препарата у детей не установлены. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к ритуксимабу, любому компоненту препарата или к белкам мыши, острые инфекционные заболевания, выраженный первичный или вторичный иммунодефицит. **Правила приготовления и хранения раствора.** Необходимое количество препарата набирают в асептических условиях и разводят до расчетной концентрации (1-4 мг/мл) в инфузионном флаконе (пакете) с 0.9% раствором натрия хлорида для инфузий или 5% раствором декстрозы (растворы должны быть стерильными и апиrogenными). Приготовленный инфузионный раствор Мабтеры физически и химически стабилен в течение 12 ч при комнатной температуре или в течение не более 24 ч при температуре от 2 до 8 °С. Мабтеру вводят внутривенно, инфузионно (медленно), через отдельный катетер. Нельзя вводить в/в болюсно или в виде в/в инъекций. **Дополнительная информация в инструкции по применению.**

МабТера
Ритуксимаб
В ЦЕНТРЕ УСПЕХА

ЗАО «Рош-Москва»
Официальный дистрибьютор
«Ф. Хоффманн - Ля Рош Лтд.» (Швейцария)
Россия, 107031 Москва
Трубная площадь, дом 2
Бизнес-центр «Неглинная Плаза»
Тел.: + 7 (495) 229-29-99
Факс: + 7 (495) 229-79-99
www.roche.ru

