

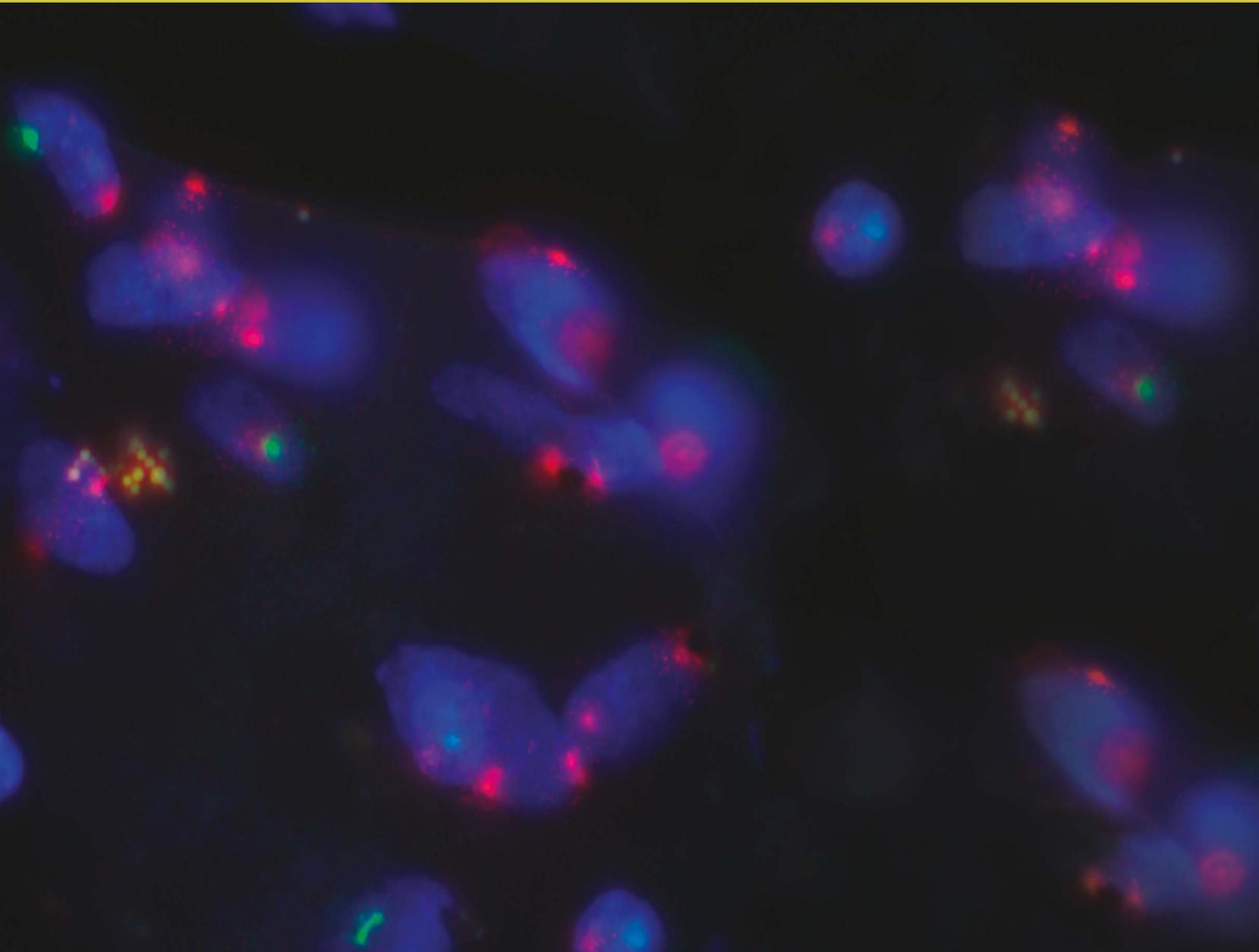
ISSN (Print) 0234-5730
ISSN (Online) 2411-3042

ФГБУ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ГЕМАТОЛОГИИ
МИНЗДРАВА РОССИИ
НАЦИОНАЛЬНОЕ
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЕ
ОБЩЕСТВО

ГЕМАТОЛОГИЯ И ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ

64.1. 2019

RUSSIAN JOURNAL
OF HEMATOLOGY AND
TRANSFUSIOLOGY
(GEMATOLOGIYA I TRANSFUSIOLOGIYA)





НАЦИОНАЛЬНОЕ
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЕ
ОБЩЕСТВО



V Конгресс
Гематологов
России

V КОНГРЕСС ГЕМАТОЛОГОВ РОССИИ

16–18 АПРЕЛЯ 2020 ГОДА, МОСКВА

Глубокоуважаемые коллеги!

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБУ «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ» МИНЗДРАВА РОССИИ
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ ИМЕНИ ДМИТРИЯ РОГАЧЕВА» МИНЗДРАВА РОССИИ
НАЦИОНАЛЬНОЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
НАЦИОНАЛЬНОЕ ОБЩЕСТВО ДЕТСКИХ ГЕМАТОЛОГОВ И ОНКОЛОГОВ
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ОНКОГЕМАТОЛОГОВ

**ПРОВОДЯТ 16–18 АПРЕЛЯ 2020 ГОДА В МОСКВЕ
V КОНГРЕСС ГЕМАТОЛОГОВ РОССИИ**

**Место проведения: Конгресс-Парк гостиницы
«Украина», г. Москва, Кутузовский пр., 2/1, стр. 1
Вся информация по Конгрессу будет размещена
на сайте Национального гематологического
общества (НГО) <https://pngo.ru>**

**На сайте НГО открыта регистрация
и подача тезисов на
V Конгресс гематологов России!**

Регистрация on-line открыта до

01.04.2020

Прием тезисов on-line открыт до

30.11.2019

Все зарегистрировавшиеся участники
будут обеспечены материалами
Конгресса. Участие в Конгрессе не
предусматривает регистрационных
взносов.

Программа секционных заседаний,
а также постерная сессия будут
формироваться на основе отбора лучших
тезисов экспертным советом Конгресса.

Журнал представлен в международной базе данных Scopus (Gematologiya i Transfuziologiya) и в российской базе РИНЦ (Российский индекс научного цитирования)

Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ журнал «Гематология и трансфузиология» включен в перечень ведущих научных рецензируемых журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук и ученой степени доктора медицинских наук

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский
центр гематологии» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Телефоны: 89268163887, 89166812291
e-mail: o.levchenko@hjournal.ru

Научный редактор Галстян Г. М.
Корректоры Пигулевская И. С., Зелексон Л. А.
Верстка Юнина О. А.

Дизайн Чулкова И. Г.

Формат 230x297 мм
Тираж 1500 экз.

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре РФ.
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-72666
от 16 апреля 2018 года

Издательство: ООО «НЭИКОН ИСП»,
115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5, офис 2.4
тел./факс: +7(499)754-99-94
<https://neicon.ru/>

Объединенный каталог
«Пресса России»: индекс 41284

Подписка через интернет: www.ppressa-ru.ru
Подписка на электронную версию журнала: elibrary.ru
Журнал открыт для ознакомления на сайте
<https://www.hjournal.ru/>

ISSN 0234-5730 (Print)
ISSN 2411-3042 (Online)

Гематология и трансфузиология.
Russian Journal of Hematology and Transfusiology
(Gematologiya i Transfuziologiya)
2019. Т. 64. №1, 205–320

© Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Контент доступен под лицензией Creative Commons
Attribution 4.0 License.

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В 1956 ГОДУ

Учредители:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Некоммерческое партнерство содействия развитию гематологии
и трансплантации костного мозга «Национальное гематологическое общество»

Цели и задачи журнала:

обобщение научных и практических достижений в области гематологии и трансфузиологии, повышение квалификации врачей различных специальностей.

Журнал «Гематология и трансфузиология» публикует оригинальные и фундаментальные исследования, лекции, обзоры и клинические наблюдения, касающиеся различных разделов гематологии, гемостазиологии и трансфузиологии: физиологии и патофизиологии кроветворения, миелопоэза, иммуногематологии, состояний и заболеваний, обусловленных нарушениями функции и количества тромбоцитов, врожденных и приобретенных нарушений коагуляции и фибринолиза, тромбозов, тромбофилий, вопросов терапии антикоагулянтами и дезагрегантами, вопросов онкогематологии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, генной терапии, экспериментальной биологии и экспериментальной терапии, эпидемиологических исследований, интенсивной терапии критических состояний, возникающих при заболеваниях системы крови, вопросов производственной трансфузиологии, а именно получения и тестирования компонентов крови, их клинического применения при различных заболеваниях.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР ЖУРНАЛА

Савченко Валерий Григорьевич

главный внештатный специалист-гематолог МЗ РФ, академик РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Галстян Геннадий Мартинович

д.м.н., заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Троицкая Вера Витальевна

к.м.н., заведующая отделением интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

ЗАВЕДУЮЩАЯ РЕДАКЦИЕЙ

Левченко Ольга Константиновна

к.м.н., старший научный сотрудник отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Афанасьев Борис Владимирович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, директор НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, заведующий кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ (Санкт-Петербург, Россия)

Буланов Андрей Юльевич, д.м.н., главный внештатный специалист-трансфузиолог Департамента здравоохранения г. Москвы, руководитель консультативной трансфузиологической бригады ГБУЗ «ГКБ № 52 ДЗ г. Москвы» (Москва, Россия)

Галенова Татьяна Владимировна, к.м.н., главный внештатный специалист-трансфузиолог МЗ РФ, заместитель генерального директора по трансфузиологии — заведующая отделом трансфузиологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Гудков Андрей Владимирович, д.б.н., профессор, директор Института рака Розвелла Парка (Баффало, США)

Звонков Евгений Евгеньевич, д.м.н., заведующий отделением интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Зозуля Надежда Ивановна, д.м.н., заведующая отделом коагулопатий ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Клясова Галина Александровна, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Ковригина Алла Михайловна, д.б.н., заведующая патологоанатомическим отделением ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Крыжановский Олег Игоревич, к.м.н., руководитель программы лечения злокачественных гематологических заболеваний онкологического центра Alta Bates Summit Medical Center (Беркли, Калифорния, США)

Купряшов Алексей Анатольевич, д.м.н., заведующий отделением переливания крови ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ (Москва, Россия)

Масчан Алексей Александрович, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заместитель генерального директора, директор Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

Менделеева Лариса Павловна, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора по научной работе и инновациям, заведующая отделением высокодозной химиотерапии парaproteinемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Никитин Евгений Александрович, д.м.н., заведующий дневным стационаром гематологии, онкологии и химиотерапии ГБУЗ г. Москвы «ГКБ им. С.П. Боткина» ДЗ г. Москвы (Москва, Россия)

Паровичникова Елена Николаевна, д.м.н., заведующая отделом химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Семочкин Сергей Вячеславович, д.м.н., профессор кафедры онкологии и гематологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ (Москва, Россия)

Судариков Андрей Борисович, д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Трахтман Павел Евгеньевич, д.м.н., заведующий отделением заготовки и процессинга гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

Тумян Гаяне Сепуговна, д.м.н., профессор кафедры онкологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ (Москва, Россия)

Чернов Вениамин Михайлович, д.м.н., член-корреспондент РАЕН, профессор, заведующий научно-консультативным отделом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Алейникова Ольга Витальевна, член-корр. НАН Беларуси, д.м.н., профессор, директор Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минск, Республика Беларусь)

Аль-Ради Любовь Саттаровна, к.м.н., зам. заведующего консультативного гематологического отделения с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Байков Вадим Валентинович, д.м.н., заведующий лабораторией патоморфологии НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ (Санкт-Петербург, Россия)

Бигильдеев Алексей Евгеньевич, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Бидерман Белла Вениаминовна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Бондаренко Сергей Николаевич, к.м.н., руководитель отдела онкологии, гематологии и трансплантологии для подростков и взрослых Института детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ (Санкт-Петербург, Россия)

Васильев Сергей Александрович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник консультативного гематологического отделения с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Гаврилина Ольга Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Гармаева Татьяна Цыреновна, д.м.н., заместитель генерального директора по организационно-методической работе и взаимодействию с регионами Российской Федерации, заведующий научно-организационным отделом по гематологии, трансфузиологии, донорству ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Головкина Лариса Леонидовна, д.м.н., заведующая лабораторией трансфузиологической иммуногематологии, ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Грицаев Сергей Васильевич, д.м.н., руководитель Республиканского центра трансплантации костного мозга ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА» (Санкт-Петербург, Россия)

Двирник Валентина Николаевна, к.м.н., заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Джулакян Унан Левонович, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Дроков Михаил Юрьевич, к.м.н., руководитель сектора по изучению иммунных воздействий и осложнений после трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Дубинкин Игорь Владимирович, к.б.н., ведущий специалист группы трансфузионной биотехнологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Ефимов Григорий Александрович, д.б.н., заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Исхаков Эльдор Джасурович, к.м.н., научный руководитель отделения гематологии НИИ гематологии и переливания крови (Ташкент, Узбекистан)

Кохно Алина Владимировна, к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Кузьмина Лариса Анатольевна, к.м.н., заведующая отделением интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Кулагин Александр Дмитриевич, д.м.н., профессор, заместитель главного врача по гематологии, онкогематологии и ревматологии Клиники ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ (Санкт-Петербург, Россия)

Куликов Сергей Михайлович, к.т.н., заведующий информационно-аналитическим отделом ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Луговская Светлана Алексеевна, д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ (Москва, Россия)

Лукина Елена Алексеевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением орфанных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Магомедова Аминат Умарасхабовна, д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов с круглосуточным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Маккарти Филип, профессор онкологии и внутренней медицины Института рака (Розвелл Парк Баффало, США)

Масчан Михаил Александрович, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора, директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ (Москва, Россия)

Михайлова Елена Алексеевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Моисеева Татьяна Николаевна, к.м.н., заведующая консультативным гематологическим отделением с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Нидервайзер Дитгер, профессор медицины, руководитель отдела гематологии и онкологии университетского госпиталя (Лейпциг, Германия)

Обухова Татьяна Никифоровна, к.м.н., заведующая лабораторией кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Салимов Эмин Львович, д.м.н., заведующий отделом заготовки крови и ее компонентов, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) МЗ РФ (Москва, Россия)

Сметанина Наталья Сергеевна, д.м.н., профессор, заместитель директора Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

Туполева Татьяна Алексеевна, д.м.н., заведующая отделом вирусологической диагностики ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Туркина Анна Григорьевна, д.м.н., профессор, заведующая научно-консультативным отделением химиотерапии миелолифферативных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Фидарова Залина Таймуразовна, к.м.н., заведующая отделением химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Фоа Робин, д.м.н., профессор гематологии, руководитель отдела гематологии Римского университета «La Sapienza» (Рим, Италия)

Хамаганова Екатерина Георгиевна, д.б.н., заведующая лабораторией тканевого типирования, ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Хелльман Ричард, преподаватель клинической медицины в больнице Лоренс Мемориал (Нью-Йорк, США)

Хольцер Дитер, профессор медицины и гематологии университета Франкфурта, вице-президент Европейской школы гематологии и европейской и немецкой сети специалистов по лейкозам, координатор европейской рабочей группы острого лимфобластного лейкоза у взрослых (Франкфурт-на-Майне, Германия)

Цаур Григорий Анатольевич, д.м.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ОКБ № 1 (Екатеринбург, Россия)

Шипунова Ирина Николаевна, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Москва, Россия)

Founders

National Research Center for Hematology of the Ministry of Health
of the Russian Federation

Non-profit partnership of assistance to development of hematology and
bone marrow transplantation «National Society of Hematology»

Aims and Scope

Hematology and Transfusiology is a peer-reviewed scholarly journal aimed at presenting scientifically and practically significant research findings in the field of hematology and transfusiology, as well as at advancing professional competencies of physicians of various specialties.

Hematology and Transfusiology publishes original research papers, reviews, clinical cases and lecture notes pertaining to a broad range of problems in the fields of hematology, hemostasiology and transfusiology. Among them are the physiology and pathophysiology of hematopoiesis, myelopoiesis, immunohematology; conditions and diseases caused by impaired platelet function and number, congenital and acquired disorders of coagulation and fibrinolysis, thrombosis, thrombophilia; therapy with anticoagulants and disaggregants; problems of oncohematology, hematopoietic stem cell transplantation, gene therapy, experimental biology and experimental therapy; epidemiological studies of blood system diseases, intensive therapy of critical conditions that arise due to various blood system diseases; issues of industrial transfusion, i.e. production of plasma and blood components for treating various diseases and conditions.

EDITOR-IN-CHIEF

Valery G. Savchenko

Dr. Sci. (Med.), Prof., Chief Hematology Specialist of the Ministry of Health of the Russian Federation, RAS Academician, Head of the National Research Center for Hematology (Moscow, Russia)

DEPUTY CHIEF EDITOR

Gennady M. Galstyan

Dr. Sci. (Med.), Head of the Intensive Care Department of the National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

EXECUTIVE SECRETARY

Vera V. Troitskaya

Cand. Sci. (Med.), Head of the Intensive High-Dose Chemotherapy Department for patients with Hematological malignancies and Hematopoietic Depressions, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

HEAD OF THE EDITORIAL OFFICE

Olga K. Levchenko

Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of the Intensive Care Department, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

EDITORIAL BOARD

Boris V. Afanasyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Honoured Doctor of the Russian Federation, Head of the Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Head of the Chair of Hematology, Transfusiology and Transplantation, Pavlov First State Medical University of St. Petersburg (St. Petersburg, Russia).

Andrei Yu. Bulanov, Dr. Sci. (Med.), Chief Transfusiology Specialist of the Moscow Healthcare Department, Head of the Transfusiology Advisory Team of the City Clinical Hospital No. 52, (Moscow, Russia).

Tatyana V. Gaponova, Cand. Sci. (Med.), Chief Transfusiology Specialist of the of the Ministry of Health of the Russian Federation, Deputy Director for Transfusiology, Head of the Department of Transfusiology, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Andrei V. Gudkov, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Director of the Roswell Park Comprehensive Cancer Center (Buffalo, USA).

Evgeny E. Zvonkov, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of High-Dose Lymphoma Chemotherapy, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Nadezhda I. Zozulya, Dr. Sci. (Med.), Head of the Coagulopathy Department, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

The journal is presented in the international database of Scopus (Gematologiya i Transfuziologiya) and russian database RSCI (Russian science citation index)

Under the decision of the Higher Attestation Commission (HAC) of the Ministry of Education and Science, Russian Journal of Hematology and Transfusiology is included in the list of leading peer-reviewed scientific journals, where the main scientific results of dissertations for academic degree of Candidate of Sciences and for academic degree of Doctor of Sciences should be published.

ADDRESS OF EDITORIAL

125167, Moscow, Novyy Zykovskiy proezd, 4
National Research Center for Hematology, Moscow

Phone: +7(495) 921-22-04
E-mail: hi@htjournal.ru

Science editor Galstyan G. M.
Correctors Pigulevskaya I. S., Zelekson L. A.
Layout of Iunina O. A.

Design by Chulkova I. G.

Format 230x297 mm
Printed copies 1500

The journal is registered in Roskomnadzor of the Russian Federation Registrations certificate
PI No. FS77-72666 dated April 16, 2018

NEICON ISP Ltd, Letnikovskaya str., 4,
bldng 5, of. 2.4, Moscow, 115114, Russia
<https://neicon.ru/>

United Catalog «Press of Russia»: Index 41284
Subscription via the Internet: www.pressa-rf.ru
Subscription to the electronic version
of the journal: elibrary.ru

ISSN 0234-5730 (Print)
ISSN 2411-3042 (Online)

Гематология и трансфузиология.
Russian Journal of Hematology and Transfusiology
(Gematologiya i Transfuziologiya)
2019. Vol. 64. No.1, 205-320

© National Research Center for Hematology, Moscow

Content is distributed
under Creative Commons Attribution 4.0 License

Galina A. Klyasova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Laboratory of Clinical Bacteriology, Mycology and Antibiotic Therapy National Research Center for Hematology (Moscow, Russia)

Alla M. Kovrigina, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Pathology Department, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia)

Oleg I. Kryzhanovskiy, Cand. Sci. (Med.), Director of Malignant Hematology Program Comprehensive Cancer Center "Alta Bates" Summit Medical Center (Berkeley, CA, USA)

Alexey A. Kupryashov, Dr. Sci. (Med.), Head of the Blood Transfusion Department, A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery (Moscow, Russia)

Alexey A. Maschan, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of the the Russian Academy of Science, Deputy General Director Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Director of the Institute of Hematology, Immunology and Cell's Technology, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia).

Larisa P. Mendeleeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Deputy Director for Research and Innovations, Head of the Department of Intensive High-Dose Chemotherapy of paraproteinemic haematological malignancies, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Evgeny A. Nikitin, Dr. Sci. (Med.), Head of the day care Department of Hematology, Chemotherapy and Oncology, Boikin Moscow City Hospital (Moscow, Russia).

Elena N. Parovichnikova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Chemotherapy of Hematological malignancies and Hematopoietic Depressions and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Sergey V. Semochkin, Dr. Sci. (Med.), Prof. of the Chair of Oncology and Hematology, Pirogov Russian National Research Medical University, (Moscow, Russia).

Andrey B. Sudarikov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Hematology, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Pavel E. Trakhtman, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Transfusiology, Procurement and Processing of Hematopoietic Stem Cells, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia).

Gayane S. Tumyan, Dr. Sci. (Med.), Prof., of the Chair of Oncology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; Leading Researcher, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of oncology" (Moscow, Russia).

Veniamin M. Chernov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of the of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Scientific Consulting Department, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia).

EDITORIAL COUNCIL

Olga V. Aleinikova, Dr. Sci. (Med.), Prof., RAS Corresponding Member, National Academy of Sciences of Belarus, Head of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology (Minsk, Belarus).

Lyubov S. Al-Radi, Cand. Sci. (Med.), Deputy Head of the Advisory Hematology Outpatient Department for Intensive High-Dose Chemotherapy, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Vadim V. Baikov, Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Associate Professor, Pathology Department, Pavlov First State Medical University of St. Petersburg (St. Petersburg, Russia).

Alexey E. Bigildeev, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Physiology of Hematopoiesis, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Bella V. Biderman, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, Federal Medical Research Center of Hematology (Moscow, Russia).

Sergey N. Bondarenko, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Oncology, Hematology and Transplantation for Adolescents and Adults, Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First State Medical University of St. Petersburg (St. Petersburg, Russia).

Sergey A. Vasiliev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Leading Researcher of the Advisory Hematology Outpatient Department for Intensive High-Dose Chemotherapy for High-Dose Chemotherapy, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Olga A. Gavrilina, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, of the Department of Chemotherapy of Hematological malignancies and Hematopoietic Depressions and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Tatyana Ts. Garmaeva, Deputy Director for Organizational and Methodological Work and Cooperation with Regions of the Russian Federation, Head of the Scientific and Organizational Department for Hematology, Transfusiology, Donation, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Larisa L. Golovkina, Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory for Transfusion Immune Hematology, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Sergey V. Gritsaev, Dr. Sci. (Med.), Head of the Republican Center for Bone Marrow Transplantation, Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology under the Federal Medico-Biological Agency (St. Petersburg, Russia).

Valentina N. Dvirnyk, Cand. Sci. (Med.), Head of the Centralized Clinical and Diagnostic Laboratory, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Hunan L. Julhakyan, Cand. Sci. (Med.), Scientific Secretary, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Mikhail Yu. Drovok, Cand. Sci. (Med.), Head of the Sector for the Study of Immune Effects and Complications After Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Igor V. Dubinkin, Cand. Sci. (Biol.), Leading specialist of the Transfusion Biotechnology Group, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Grigory A. Efimov, Dr. Sci. (Biol.), Head of Transplant Immunology Laboratory, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Eldor D. Iskhakov, Cand. Sci. (Med.), Scientific Director, Department of Hematology, Scientific Research Institute for Hematology and Blood Transfusion (Tashkent, Uzbekistan).

Alina V. Kokhno, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, of the Department of Chemotherapy of Hematological malignancies and Hematopoietic Depressions and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Larisa A. Kuzmina, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Intensive High-Dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Alexander D. Kulagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Deputy Chief Doctor for Hematology, Oncohematology and Rheumatology, Pavlov First State Medical University of St. Petersburg (St. Petersburg, Russia).

Sergey M. Kulikov, Cand. Sci. (Engineering), Head of the Information and Analytical Department, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Svetlana A. Lugovskaya, Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Moscow, Russia).

Elena A. Lukina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Orphan Diseases Department, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Aminat U. Magomedova, Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy of Hematological malignancies, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Philip McCarthy, MD, Prof. of Oncology and Internal Medicine, Roswell Park Comprehensive Cancer Center (Buffalo, USA).

Mikhail A. Maschan, Dr. Sci. (Med.), Prof., Deputy General Director, Director of the Higher School of Molecular and Experimental Medicine, Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia).

Elena A. Mikhailova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Leading Researcher, of the Department of Chemotherapy of Hematological malignancies and Hematopoietic Depressions and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Tatyana N. Moiseeva, Cand. Sci. (Med.), Head of the Advisory Hematology Outpatient Department for Intensive High-Dose Chemotherapy, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Dietger Niederwieser, MD, Professor of Medicine, Head of the Department of Hematology and Oncology, Leipzig University Clinic (Leipzig, Germany).

Tatyana N. Obukhova, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Karyology, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Emin L. Salimov, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Blood and its Component Banking; Prof., Department of Anesthesiology and Resuscitation, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (Moscow, Russia).

Nataliya S. Smetanina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Deputy Director of the Institute of Hematology, Immunology and Cell's Technology Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia).

Tatyana A. Tupoleva, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Virological Diagnostics, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Anna G. Turkina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Scientific Advisory Department of Chemotherapy of Myeloproliferative Diseases, National Research Center for Hematology, (Moscow, Russia).

Zalina T. Fidarova, Cand. Sci. (Med.), Head of day hospital for Chemotherapy of Hematological malignancies and Hematopoietic Depressions, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Robin Foa, MD, Professor of Hematology, Head of the Department of Hematology, University of Rome "La Sapienza" (Rome, Italy)

Ekaterina G. Khamaganova, Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Tissue Typing, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

Richard M. Hellman, MD, Prof. of Hematology and Medical Oncology, Lawrence Memorial Hospital (New London, USA).

Dieter Hoelzer, MD, PhD, Prof. of Internal Medicine, University of Frankfurt; Vice-President of the European School of Hematology and the European and German Network of Specialists on Leukemia; Coordinator of the European Working Group for Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults (Frankfurt, Germany)

Grigoriy A. Tsaurov, Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Biology, Immunophenotyping and Pathomorphology, Sverdlovsk Region Clinical Hospital No. 1 (Ekaterinburg, Russia)

Irina N. Shipunova, Dr. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Physiology of Hematopoiesis, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia).

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные статьи

- 7–15 Голенков А. К., Трифонова Е. В., Катаева Е. В., Митина Т. А., Высоцкая Л. Л., Черных Ю. Б., Клинушкина Е. Ф., Белоусов К. А., Когарко И. Н., Захаров С. Г., Караулов А. В., Когарко Б. С., Марьяна С. А.
Анализ свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови в оценке эффективности химиотерапии множественной миеломы с интактным измеряемым парапротеином
- 16–20 Жибурт Е. Б., Чемоданов И. Г., Шестаков Е. А.
Производство криопреципитата в России: прошлое, настоящее и будущее
- 21–34 Кислицына М. А., Обухова Т. Н., Алимova Г. А., Шишигина Л. А., Гребенюк Л. А., Абрамова Т. В., Горячева С. Р., Моисеева Т. Н.
Эффективность использования олигонуклеотида DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 для выявления хромосомных aberrаций у больных хроническим лимфолейкозом
- 35–48 Кузьмина Л. А., Конова З. В., Паровичникова Е. Н., Дроков М. Ю., Васильева В. А., Попова Н. Н., Савченко В. Г.
Повторная трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных гемобластозами
- 49–59 Соловьева А. А., Яцык Г. А., Пономарев Р. В., Лукина К. А., Костина И. Э., Мамонов В. Е., Лукина Е. А.
Обратимые и необратимые изменения костно-суставной системы при болезни Гоше I типа
- 60–65 Колосков А. В., Чернова Е. В.
Распространенность мутации гена фактора V (Лейден) и гена протромбина G20210A у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа
- 66–72 Козырева В. С., Шилова А. Н., Шкода О. В.
Использование метода проточной цитометрии для контроля содержания остаточных лейкоцитов в плазме крови
- 73–78 Хурдин В. В., Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В.
Получение очищенного концентрата фибриногена
- 79–89 Назарова Е. Л., Минаева Н. В., Зотина Е. Н., Докшина И. А., Сухорукова Э. Е., Шардаков В. И.
Молекулярные маркеры бортезомиб-индуцированной полинейропатии у больных множественной миеломой

Обзоры литературы

- 90–98 Галаяудинов Г. С., Фейсханова Л. И., Абдуллаев Ш. П.
Плейотропные эффекты оральных антикоагулянтов

CONTENTS

Original Articles

- Golenkov A. K., Trifonova E. V., Kataeva E. V., Mitina T. A., Vusotskaya L. L., Chernykh Yu. B., Klinushkina E. F., Belousov K. A., Kogarko I. N., Zakharov S. G., Karaulov A. V., Kogarko B. S., Maryina S. A.
Assay of immunoglobulin free light chains in the serum for evaluating chemotherapy efficacy in patients suffering from multiple myeloma with intact measurable paraprotein
- Zhiburt E. B., Chemodanov I. G., Shestakov E. A.
Cryoprecipitate production in Russia: past, present and future
- Kislitsyna M. A., Obukhova T. N., Alimova G. A., Shishigina L. A., Grebenyuk L. A., Abramova T. V., Goryacheva S. R., Moiseeva T. N.
Efficacy of oligonucleotide DSP30 in combination with Interleukin-2 for the detection of chromosomal aberrations in patients with chronic lymphocytic leukemia
- Kuzmina L. A., Konova Z. V., Parovichnikova E. N., Drovkov M. Y., Vasilyeva V. A., Popova N. N., Savchenko V. G.
Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies
- Soloveva A. A., Yatsyk G. A., Ponomarev R. V., Lukina K. A., Kostina I. E., Mamonov V. E., Lukina E. A.
Reversible and irreversible radiological signs of bone involvement in type I Gaucher disease
- Koloskov A. V., Chernova E. V.
Prevalence of factor v leiden and prothrombin G20210A in women with von Willebrand disease type 1
- Kozyreva V. S., Shilova A. N., Shkoda O. S.
Flow cytometry for measuring residual leukocytes in blood plasma
- Khurdin V. V., Berkovskiy A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V.
Production of purified fibrinogen concentrate
- Nazarova E. L., Minaeva N. V., Zotina E. N., Dokshina I. A., Suhorukova E. E., Shardakov V. I.
Molecular features of bortezomib-induced neuropathy in patients with multiple myeloma

Review Articles

- Galyautdinov G. S., Feiskhanova L. I., Abdullaev Sh. P.
Pleiotropic effects of oral anticoagulants

АНАЛИЗ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ С ИНТАКТНЫМ ИЗМЕРЯЕМЫМ ПАРАПРОТЕИНОМ

Голенков А. К.^{1*}, Трифонова Е. В.¹, Катаева Е. В.¹, Митина Т. А.¹, Высоцкая Л. Л.¹, Черных Ю. Б.¹, Клинушкина Е. Ф.¹, Белоусов К. А.¹, Когарко И. Н.², Захаров С. Г.¹, Караулов А. В.³, Когарко Б. С.², Марьяна С. А.⁴

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова» РАН, 119991, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: изучить концентрацию свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов сыворотки крови и сравнить с концентрацией интактного и измеряемого парапротеина (PIg) у больных рецидивирующей/резистентной множественной миеломой (РР ММ) в процессе лечения бортезомибом.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включено 15 больных РР ММ с интактным и измеряемым PIg (G/κ, G/λ, A/κ). После завершения 6 противорецидивных циклов лечения бортезомибом оценку эффективности проводили по стандартным критериям и по анализу СЛЦ на анализаторе Hitachi 911. Использовали антитела к скрытым детерминантам СЛЦ (The Binding Site, Великобритания).

Результаты. Частичный ответ (ЧО) был получен у 4, малый ответ у 5, стабилизация болезни у 6 больных. Не было случаев достижения полного ответа (ПО) или строгого полного ответа (СПО). На основании результатов анализа концентрации СЛЦ после лечения все больные были разделены на 2 группы с клональным или нормальным κ/λ-отношением. У 11 больных с ответом менее ЧО κ/λ-отношение носило клональный характер, что соответствовало концентрации интактного PIg. В то же время в 4 наблюдениях (ЧО) κ/λ-отношение СЛЦ было нормальным.

Полученные результаты показали, что у 11 из 15 больных концентрация СЛЦ после курсов химиотерапии совпадала с концентрацией интактного PIg. У 4 из 15 больных такого совпадения не установлено. Вероятно, лечение бортезомибом наряду с противоопухолевым действием снижает активность генов, синтезирующих СЛЦ, что нормализует отношения легких и тяжелых цепей в опухолевой клетке. С учетом клинических данных это можно рассматривать как фактор благоприятного прогноза.

Заключение. Метод определения СЛЦ можно использовать при РР ММ с интактным измеряемым PIg в качестве оценки эффективности химиотерапии. Факты остановки синтеза опухолевых СЛЦ при ЧО у 4 из 15 больных следует учитывать при установлении СПО. Остановка синтеза опухолевых СЛЦ имеет благоприятный клинический прогноз.

Ключевые слова: множественная миелома, свободные легкие цепи, κ/λ-отношение

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Голенков А.К., Трифонова Е.В., Катаева Е.В., Митина Т.А., Высоцкая Л.Л., Черных Ю.Б., Клинушкина Е.Ф., Белоусов К.А., Когарко И.Н., Захаров С.Г., Караулов А.В., Когарко Б.С., Марьяна С.А. Анализ свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови в оценке эффективности химиотерапии множественной миеломы с интактным измеряемым парапротеином. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 7–15. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-7-15>

ASSAY OF IMMUNOGLOBULIN FREE LIGHT CHAINS IN THE SERUM FOR EVALUATING CHEMOTHERAPY EFFICACY IN PATIENTS SUFFERING FROM MULTIPLE MYELOMA WITH INTACT MEASURABLE PARAPROTEIN

Golenkov A. K.^{1*}, Trifonova E. V.¹, Kataeva E. V.¹, Mitina T. A.¹, Vusotskaya L. L.¹, Chernykh Yu. B.¹, Klinushkina E. F.¹, Belousov K. A.¹, Kogarko I. N.², Zakharov S. G.¹, Karaulov A. V.³, Kogarko B. S.², Maryina S. A.⁴

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute, 129110, Moscow, Russian Federation

² Semenov Institute of Chemical Physics of RAS, 119991, Moscow, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

⁴ National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the concentration of immunoglobulin free light chains (FLC) in comparison with that of intact measurable paraproteins (PIg) in patients with relapsed/resistant multiple myeloma (RR MM) undergoing treatment with bortezomib.

Materials and methods. A retrospective study included 15 patients with RR MM with intact measurable PIg. Following 6 cycles of bortezomib treatment, an evaluation of the treatment efficacy was performed using standard criteria and by analysing serum FLC of immunoglobulins (sFLC).

Results. A partial response (PR) and small response was achieved in 4 and 5 patients, respectively. The stabilization of the disease was observed in 6 patients. No cases of complete response (CR) or stringent complete response (SCR) were recorded. On the basis of the data on the concentration of sFLC after treatment, all patients were divided into 2 groups: those with an abnormal (clonal) and normal κ/λ ratio. In 11 patients with a response lower than PR, sFLC κ/λ ratio was of a clonal nature, which corresponded to changes in the concentrations of intact PIg during treatment. In 4 cases with PR, the residual tumour was determined by the presence of intact PIg within the 32–45 % range under, however, a normal sFLC κ/λ ratio.

Conclusion. Treatment with bortezomib affects all processes in MM with intact PIg, such as synthesis of FLC by tumour plasma cells, a decrease in the amount of circulating sFLC in blood and in the concentration of intact PIg. Normalization of sFLC κ/λ ratio under the achievement of PR could be considered as a prognostic factor in a favourable clinical outcome.

Keywords: multiple myeloma, free light chains, κ/λ ratio

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Golenkov A.K., Trifonova E.V., Kataeva E.V., Mitina T.A., Vusotskaya L.L., Chernykh Y.B., Klinushkina E.F., Belousov K.A., Kogarko I.N., Zakharov S.G., Karaulov A.V., Kogarko B.S., Maryina S. A. Assay of immunoglobulin free light chains in the serum for evaluating chemotherapy efficacy in patients suffering from multiple myeloma with intact measurable paraprotein. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 7–15 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-7-15>

Введение

Анализ свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов сыворотки крови широко применяется в диагностике множественной миеломы (ММ). Клональные плазматические клетки при этих заболеваниях продуцируют парапротеин (PIg) (моноклональный

иммуноглобулин), представляющий собой полную молекулу (интактный PIg) и состоящий из 2 легких цепей (κ или λ) и двух тяжелых цепей. При ММ легких цепей (ММ ЛЦ) синтезируются только легкие цепи. При клональных процессах плазматические клетки

синтезируют P₁g одного изотипа легкой (κ или λ) и тяжелой цепи, хотя их синтез в клетке происходит раздельно. При этом небольшое количество несвязанных СЛЦ попадает в сыворотку, где они могут быть определены нефелометрическим методом на автоматических анализаторах. Для этого используются диагностические антитела к скрытым детерминантам СЛЦ [13]. Этот метод раскрыл новые стороны патогенеза ММ, в частности касающиеся поражения почек. Определение концентрации СЛЦ в сыворотке ММ ЛЦ позволило установить концентрации, при которых риск поражения почек многократно возрастает. Это означает, что при впервые выявленной ММ ЛЦ измененное κ/λ-отношение в сыворотке и определяемый уровень опухолевых (вовлеченных) СЛЦ имеют большее клиническое значение, чем при исследовании мочи. Поэтому после лечения ММ ЛЦ критерием эффективности и последующего мониторинга должно быть определение СЛЦ сыворотки [1]. Полученные результаты позволили изменить принципы лечения и мониторинга ММ ЛЦ, осложненной хронической почечной недостаточностью (ХПН), которые заключаются в применении противоопухолевого лечения в сочетании с гемодиализом и экстракорпоральным селективным удалением СЛЦ сыворотки [2, 3]. Большое значение имеет данный метод в определении рисков развития активной ММ с поражением внутренних органов из моноклональной гаммапатии неясного значения и тлеющей ММ (ТММ) [4–6]. Дальнейшее изучение возможностей клинического применения этого метода касалось характеристики остаточной болезни при ММ. Актуальность этой проблемы была связана с внедрением в клиническую практику новых эффективных лекарственных препаратов и прямой связью глубины противоопухолевого ответа с общей выживаемостью (ОВ) [7].

По существу, складывалась ситуация, когда разрешительная способность существовавших методов оценки остаточной болезни не соответствовала возросшим возможностям химиотерапии ММ. В связи с этим в новую оценочную систему была включена категория строгого полного ответа, включающая нормальное κ/λ-отношение СЛЦ, отрицательные результаты иммунофиксации и отсутствие клональных плазматических клеток в костном мозге [8]. Метод анализа СЛЦ имеет не только клиническое значение. Особенности метаболизма СЛЦ, их короткий период полураспада позволяют использовать этот метод для решения некоторых фундаментальных клинических задач ММ. В этой связи интересны исследования, направленные на изучение фармакодинамики новых лекарственных препаратов на основе анализа СЛЦ. Динамическое исследование концентраций опухолевых СЛЦ (ОСЛЦ) при проведении 11-дневного курса лечения бортезомибом у 14 больных с резистентным/рецидивирующим течением ММ (РР ММ) выявило больных, опухолевые клетки которых были

чувствительны или резистентны к этому препарату. Положительный результат был зафиксирован при снижении концентрации ОСЛЦ на 50 % к 11-му дню курса. Этот результат имел прогностическое значение и был подтвержден полученной ремиссией после завершения 6-циклового индукционного периода лечения. При анализе фармакодинамических кривых после проведения 1-го курса лечения установлен фазовый характер противоопухолевого ответа, что можно учитывать при создании многокомпонентных программ терапии. У 11 из 14 больных был интактный P₁g [9]. Метод определения СЛЦ сыграл определенную роль в уточнении патогенеза компрессионно-корешкового синдрома у больных ММ. С его помощью было установлено, что при одновременном исследовании концентраций СЛЦ сыворотки и СЛЦ ликвора их повышение в ликворе указывало на существующую интратекальную плазмоклеточную инфильтрацию [10].

Определение СЛЦ при хроническом лимфолейкозе является новым направлением и имеет большое прогностическое значение. Моноклональное и поликлональное повышение их концентраций в сыворотке крови, а также изменение κ/λ-отношения при нормальных концентрациях СЛЦ ассоциировано с уменьшением ОВ [11]. Результаты большого количества исследований, касающихся клинического применения метода определения СЛЦ, базируются на концепции синтеза и секреции СЛЦ одной опухолевой клеткой в ассоциации с тяжелой цепью или селективно, что является кинетическим маркером опухоли. В этой связи результаты некоторых исследований трудно объяснить с данных позиций. В исследовании [12], включавшем 449 больных с впервые выявленной ММ, у которых в сыворотке крови выявлялся интактный и измеряемый P₁g, анализ СЛЦ был проведен в среднем через 6,9 мес. после завершения индукционного лечения. Установлено, что в 34 % наблюдений достигнута нормализация κ/λ-отношения СЛЦ, при этом частичный ответ (ЧО) не был достигнут по стандартным критериям оценки, причем это значительно увеличивало беспрогрессивную выживаемость и ОВ. Полученные данные делают актуальным вопрос о механизмах секреции СЛЦ плазматическими клетками при секреции интактных P₁g. Авторы [12] высказали предположение о существовании субклона плазматических клеток, которые синтезируют только СЛЦ.

Цель исследования — оценка прогностического значения измерения концентрации СЛЦ иммуноглобулинов сыворотки крови в сравнении со стандартными критериями эффективности лечения у больных ММ с интактным и измеряемым P₁g.

Материалы и методы

Настоящее исследование представляет собой ретроспективный анализ результатов лечения 15 больных РР ММ бортезомибом после потери клинического от-

вета на ранее применяемые программы на основе алкилирующих препаратов. Проводили от 4 до 6 курсов лечения бортезомибом, продолжительность курса составила 28 дней. Всем больным проводили стандартные иммунохимические исследования P_{Ig} до и после проведения 4–6 курсов лечения. Для диагностики, стадирования и оценки эффективности лечения использовали международные критерии (IMWY) [13]. Концентрацию СЛЦ определяли нефелометрическим методом до и после лечения на автоматическом анализаторе Hitachi-911 (Япония). Проводили два отдельных измерения для κ и λ СЛЦ в сыворотке крови. При этом использовали диагностические антитела к скрытым детерминантам СЛЦ (The Binding Site, Великобритания). Нормальные значения концентраций составляют: κ-СЛЦ — 7,3 (3,3–19,4) мг/л; λ-СЛЦ — 12,7 (5,7–26,3) мг/л. Клональными изменениями концентраций СЛЦ считали значения κ/λ-отношения СЛЦ, выходящие за пределы нормальных (0,26–1,65). При наличии клона κ-продуктов κ/λ-отношение было более 1,65, при λ-клоне κ/λ-отношение было менее 0,26 (1; 12).

Статистическую обработку результатов провели с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни.

Результаты

Всего в исследование было включено 9 мужчин и 6 женщин в возрасте 41–73 года (средний возраст — 57 лет). У всех диагностирована III стадия ММ. Среднее количество курсов химиотерапии — 5 (от 3 до 25 курсов) на основе алкилирующих препаратов (М-2, VMCP). У 11 больных диагностирована IgG ММ (κ — у 7, λ — у 4), у 4 — IgA/κ. Проведенное противорецидивное лечение бортезомибом позволило получить ЧО у 4 (26,6 %) больных. При этом установлено снижение P_{Ig} в интервале 50–90 %. У остальных больных снижение P_{Ig} в сыворотке крови составило менее 50 %, из них у 5 больных диагностирован малый ответ

(МО) (снижение концентрации P_{Ig} в сыворотке крови на 26–49 %), у 6 больных — стабилизация болезни (СБ) (снижение концентрации P_{Ig} в сыворотке крови менее чем на 25 %).

Анализ концентраций ОСЛЦ-κ был проведен у 11 больных с κ-изотипом интактного P_{Ig} после курсов противорецидивного лечения бортезомибом с одновременным проведением электрофореза сыворотки крови и мочи, с иммунофиксацией (табл. 1).

Из 11 больных ЧО + МО были достигнуты у 7 больных. В этих наблюдениях отмечено снижение концентраций P_{IgG} и P_{IgA} изотипов в сыворотке крови до 58,5 (45–73) % от исходных значений. Эти результаты статистически значимо различались от результатов лечения больных, у которых достигнута СБ при остаточных значениях P_{Ig} 95,2 (89–100) %. Анализ концентраций ОСЛЦ-κ показал схожую динамику изменений. При максимальном снижении сывороточной концентрации интактного P_{Ig} в группе ЧО + МО отношение концентраций ОСЛЦ-κ к нормальному изотопу СЛЦ-κ было статистически значимо ниже 7,5 (1,1–14), чем у больных с СБ 39,3 (24,1–66,5), где снижение сывороточной концентрации интактного P_{Ig} было минимальным. Для оценки динамики изменений концентраций после лечения всей группы больных (n = 15), включающей 4 случая IgG/λ PP MM, изучены отношения ОСЛЦ κ/λ концентраций, достигнутых после лечения к нормальным значениям изотипов ОСЛЦ κ и λ (табл. 2).

Представленные в таблице 2 результаты подтвердили связь между сывороточной концентрацией интактного P_{Ig} κ- и λ-изотипов после лечения и отношением концентраций κ- и λ-ОСЛЦ/НСЛЦ. Более низкий достигнутый уровень P_{Ig} после лечения при ЧО + МО 53,8 (32–73) % статистически значимо различался с показателями P_{Ig} у больных с СБ 93,3 (87–100) %. При этом отношение концентраций κ- и λ-ОСЛЦ относительно нормы совпадало с изменениями интактного P_{Ig}. Оно

Таблица 1. Отношение концентраций опухолевых κ-СЛЦ и нормальных значений изотипа у 11 больных PP MM с интактным измеряемым P_{IgG} и P_{IgA} в зависимости от категории противоопухолевого ответа

Table 1. Ratio of tumour κ-FLC concentrations and normal isotype values in 11 patients with RR MM with intact measurable P_{IgG} and P_{IgA} depending on the category of antitumour response

Изотип P _{Ig} P _{Ig} Isotype	n	Ответ на лечение Response to Treatment		
		категория category	P _{Ig} , %*	отношение концентраций ОСЛЦ-κ / НСЛЦ-κ** concentration ratio TFLC-κ / NFLC-κ**
IgG κ	7	ЧО + МО PR + MR	58,5 (45–73)	7,5 (1,1–14)
IgA κ	4	СБ SD	95,2 (89–100)	39,3 (24,1–66,5)

Примечание. Здесь и в табл. 2 p < 0,05: * — достигнутый после лечения уровень P_{Ig} (в г/л) по отношению к его стартовому значению в %; ** — отношение достигнутых после лечения концентраций ОСЛЦ-κ к нормальным значениям изотипа. НСЛЦ-κ — нормальные средние значения СЛЦ-κ.

Note. Here and in Tab. 2 p < 0.05: * — P_{Ig} level achieved in treatment (in g/L) relative to its initial level in %; ** — ratio of the concentrations of TFLC-κ achieved following treatment to the normal isotype values. NFLC-κ — normal average values FLC-κ.

PR — partial response, SD — stable disease, minimal response, TFLC — tumour free light chain, NFLC — normal free light chain.

Таблица 2. Отношение концентраций опухолевых κ- и λ-СЛЦ и нормальных значений изомеров у 15 больных РР ММ с интактным измеряемым P_{lg} в зависимости от категории противоопухолевого ответа

Table 2. Ratio of the concentrations of tumour κ- and λ-FLC and the normal isotype values in 15 patients with RR MM with intact measurable P_{lg} depending on the category of antitumour response

Изотип P _{lg} P _{lg} Isotype	Ответ на лечение Response to Treatment		
	категория category	P _{lg} , %*	отношение концентраций ОСЛЦ (κ и λ) НСЛЦ (κ и λ)** concentration ratio TFLC-κ/ NFLC/κ **
IgG/κ (n = 7) IgG/λ (n = 4) IgA/κ (n = 4)	ЧО+МО (n = 9) PR+ MR (n = 9)	53,8 (32–73)	6,2 (1,2–10,6)
	СБ (n = 6) SD (n = 6)	93,3 (87–100)	36,4 (5,2–92,8)

Таблица 3. Анализ κ/λ-отношений СЛЦ сыворотки крови у 15 больных РР ММ с интактным измеряемым P_{lg} после проведения индукционной химиотерапии

Table 3. Analysis of the κ/λ ratios of serum FLC in 15 patients with RR MM with intact measurable P_{lg} following induction chemotherapy

№ наблюдения № of observation	Стадия ММ Stage of MM	Изотип P _{lg} P _{lg} isotype	Категория ответа Response category	Снижение P _{lg} в % к исходному P _{lg} reduction in % to baseline	κ/λ-отношение κ/λ-ratio
МО + СБ MR + SD					
1	III	G/κ	МО MR	55	2,8
2	III	G/κ	МО MR	60	4,2
3	III	G/κ	МО MR	67	6,1
4	III	G/κ	МО MR	70	6,7
5	III	G/κ	МО MR	73	8,4
6	III	G/κ	СБ SD	100	38,3
7	III	A/κ	СБ SD	95	13,9
8	III	A/κ	СБ SD	97	19,3
9	III	A/κ	СБ SD	89	28,9
10	III	G/λ	СБ SD	92	0,004
11	III	G/λ	СБ SD	87	0,1
ЧО / PR					
12	III	G/λ	ЧО PR	32	0,27
13	III	G/λ	ЧО PR	43	0,43
14	III	G/κ	ЧО PR	40	0,68
15	III	A/κ	ЧО PR	45	1,2

Примечание. Жирным шрифтом выделено κ/λ-отношение в пределах нормы (норма 0,26–1,65).

Note. κ/λ-ratio within the normal range (the norm is 0.26–1.65) is marked in bold.

составляло 6,2 (1,2–10,6) при ЧО ± МО и 36,4 (5,2–92,8) при СБ. Повышение концентрации СЛЦ, гомологичных ЛЦ интактного РІg, свидетельствует об их опухолевом характере. Однако для подтверждения клональности СЛЦ необходимо определение к/λ-отношения. Учитывая это, проведен анализ к/λ-отношения параллельно с процентом снижения интактного РІg после лечения у 15 больных РР ММ (табл. 3).

Полученный после лечения ответ соответствовал категориям МО, ЧО и СБ. Не было получено ПО и строгого ПО (СПО). Процент снижения РІg при этом был в пределах 32–100 % от исходного. У 11 из 15 больных к/λ-отношение СЛЦ было изменено, что соответствовало опухолевой клональности соответствующего изотипа; достигнутая сывороточная концентрация интактного РІg была в пределах 55–100 % относительно его исходных значений. У 4 больных, достигших ЧО, снижение РІg от исходных значений составило: РІgGκ — 40 %; РІgAκ — 45 %; РІgGλ — 32 %; РІgGλ — 43 %, к/λ-отношение было в пределах нормы и составляло соответственно 0,68; 1,2; 0,27; 0,43.

Обсуждение

Проведенное исследование посвящено изучению концентрации СЛЦ у больных РР ММ с интактным измеряемым РІg в сыворотке крови. Важность этого исследования связана с недостаточной информацией о клинической значимости интактного измеряемого РІg в сыворотке крови, за исключением констатации СПО. В то же время клиническое значение анализа СЛЦ при ТММ, ММ с не измеряемым в сыворотке крови РІg доказано во многих работах [5]. Интерес к проведению подобных исследований базируется на концепции избыточного синтеза СЛЦ опухолевой плазматической клеткой, которые после соединения с тяжелой цепью Іg и формирования интактной молекулы РІg секретируются за пределы клетки. Результаты наших исследований подтверждают эти предположения. Установлено, что ОСЛЦ κ- и λ-изотипов у ответивших на лечение больных были статистически значимо меньше, чем у больных, не ответивших на лечение. Полученные данные свидетельствуют, что динамика изменения сывороточных концентраций ОСЛЦ повторяет динамику изменений концентраций интактных молекул РІg при проведении противоопухолевой химиотерапии. Это может служить основанием для более широкого использования анализа ОСЛЦ для оценки эффективности лечения. Однако при установлении клональности ОСЛЦ, отражающей отношение ОСЛЦ к невовлеченной СЛЦ, у 4 из 15 больных такой закономерности не было установлено. При достигнутой после лечения сывороточной концентрации интактного РІg (2 — Gλ; 1 — Gκ; 1 — Aκ) от 32 до 45 % от исходного к/λ-отношение было в пределах нормальных значений (0,26–1,65). Оче-

видно, что эти данные противоречат существующей концепции об избыточном синтезе СЛЦ опухолевой клеткой при ММ с интактным РІg и совпадающей фармакокинетики интактного РІg и ОСЛЦ в процессе лечения. Все это свидетельствует об уменьшении продукции ОСЛЦ плазматической клеткой при сохранном синтезе интактного РІg. Подобный результат был получен и другими авторами [12], которые в ретроспективном исследовании показали нормализацию к/λ-отношения при противоопухолевом ответе по интактному РІg < ЧО у 34 % больных ММ. При этом было высказано предположение о существовании субклона миеломных клеток, секретирующих только ОСЛЦ, который был разрушен воздействием противоопухолевой химиотерапии.

В нашем исследовании отсутствие синтеза ОСЛЦ при достигнутом ЧО по интактному РІg установлено у 26,6 % больных. В качестве объяснения описанного феномена может быть высказано и другое предположение. Применение цитостатических препаратов (чаще леналидомида, бортезомиба, дексаметазона) влияет на геном миеломной клетки, снижая активность гена, синтезирующего СЛЦ, выравнивая тем самым внутриклеточный баланс легких и тяжелых цепей Іg на остаточной опухоли в рамках ЧО. По существу, речь идет о нестабильности генома плазматической клетки в отношении синтеза СЛЦ. В пользу этого предположения может свидетельствовать ранее описанный феномен избирательного выброса ОСЛЦ (escape) при ММ с ремиссией по интактному РІg [5]. В дальнейшем это приводило к рецидиву заболевания. Однако это предположение может быть подтверждено анализом экспрессии генов, кодирующих синтез легких цепей иммуноглобулинов.

Таким образом, согласованный синтез ОСЛЦ и тяжелой цепи РІg может быть нарушен в плазматической клетке спонтанно или под влиянием химиотерапии. В этой связи выброс ОСЛЦ (escape) или остановку их синтеза следует рассматривать как закономерные процессы, характеризующие активность плазматической клетки. Если основываться на опубликованных данных [7, 12], выброс ОСЛЦ является признаком доклинического рецидива болезни, а остановка синтеза — это позитивный клинический прогностический признак. Наши данные не позволяют доказать подобное заключение из-за ограниченного количества наблюдений, хотя остановка синтеза СЛЦ при достигнутом уровне интактного РІg 32–45 % в рамках ЧО при РР ММ является благоприятным прогностическим фактором.

Полученные нами данные, а также опубликованная работа [12] позволяют говорить о нарушенной синхронизации синтеза СЛЦ и тяжелых цепей в миеломной клетке при ММ с интактным РІg, что следует учитывать в клинической практике, в диагностике, прогнозе и оценке лечения ММ.

Литература

1. Dejoie T., Corre J., Caillon H., et al. Serum free light chains not urine specimens, should be used to evaluate response in light-chain multiple myeloma. *Blood*. 2016; 128(25): 2941–8.
2. Митина Т.А., Голенков А.К., Луцкая Т.Д., Катаева Е.В. Эффективность лечения множественной миеломы, осложненной почечной недостаточностью, бортезомибсодержащими программами в сочетании с гемодиализом. *Гематология и трансфузиология*. 2011; 56(4): 12–6.
3. Hutchison C.A., Heyne N., Airia P., et al. Immunoglobulin free light chain levels and recovery from myeloma kidney on treatment with chemotherapy and high cut-off haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2012; 27(10): 3823–8.
4. Rajkumar S.V., Demopoulos M.A., Palumbo A. International myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15(12): 538–48.
5. Dispenzieri A., Kyle R.A., Katzmann J.A. Immunoglobulin free light chain ratio is independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 2008; 111(2): 785–9.
6. Waxman A.J., Mick R., Garfall A.L. Modeling the risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Proc. Am. Clin. Oncol*. 2014; 32: abstr. A8607.
7. van de Velde H.J., Liu X., Chen G. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica*. 2007; 92(10): 1399–406.
8. Rajkumar S.V., Harousseau J.L., Durie B., et al. International Myeloma Workshop Consensus Panel I. Consensus recommendation for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel I. *Blood*. 2011; 117(18): 4691–5.
9. Голенков А.К., Митина Т.А., Когарко И.Н. и др. Фармакодинамическая характеристика эффективности велкейда при рецидивной и резистентной множественной миеломе на основе анализа свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови. *Терапевтический архив*. 2009; 81(7): 37–41.
10. Голенков А.К., Трифонова Е.В., Митина Т.А. Сравнительный анализ концентраций свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки и спинномозговой жидкости при множественной миеломе, осложненной опухолевой миелорадикуллопатией. *Гематология. Трансфузиология*. 2016; 2(1): 24–31.
11. Maurer M.J., Cerhan J.R., Katzmann J.A. Monoclonal and polyclonal serum free light chains outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009; 118(10): 2821–6.
12. Moustafa M.A., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. Utility of serum free light chain measurements in multiple myeloma patients not achieving complete response to therapy. *Leukemia*. 2015; 29(10): 2033–8.
13. Dispenzieri A., Kyle R., Merlini G., et al. International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009; 23(2): 215–24.

Информация об авторах

Голенков Анатолий Константинович*, доктор медицинских наук, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: golenkov@monikiweb.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6523-9157>

Трифопова Елена Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии

References

1. Dejoie T., Corre J., Caillon H., et al. Serum free light chains not urine specimens, should be used to evaluate response in light-chain multiple myeloma. *Blood*. 2016; 128(25): 2941–8.
2. Mitina T.A., Golenkov A.K., Lutskaia T.D., Kataeva E.V. The effectiveness of treatment of multiple myeloma complicated by renal insufficiency, programs containing bortezomib in combination with hemodialysis. *Gematologiya i Transfuziologiya*. 2011; 56(4): 12–6 (In Russian).
3. Hutchison C.A., Heyne N., Airia P., et al. Immunoglobulin free light chain levels and recovery from myeloma kidney on treatment with chemotherapy and high cut-off haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2012; 27(10): 3823–8.
4. Rajkumar S.V., Demopoulos M.A., Palumbo A. International myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15(12): 538–48.
5. Dispenzieri A., Kyle R.A., Katzmann J.A. Immunoglobulin free light chain ratio is independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 2008; 111(2): 785–9.
6. Waxman A.J., Mick R., Garfall A.L. Modeling the risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Proc. Am. Clin. Oncol*. 2014; 32: abstr. A8607.
7. van de Velde H.J., Liu X., Chen G. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica*. 2007; 92(10): 1399–406.
8. Rajkumar S.V., Harousseau J.L., Durie B., et al. International Myeloma Workshop Consensus Panel I. Consensus recommendation for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel I. *Blood*. 2011; 117(18): 4691–5.
9. Golenkov A.K., Mitina T.A., Kogarko I.N., et al. Pharmacodynamic characteristics of velcade efficacy in resistant and recurrent multiple myeloma: determination of free light chains of blood serum immunoglobulins. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2009; 81(7): 37–41 (In Russian).
10. Golenkov A.K., Trifonova E.V., Mitina T.A. Comparative analysis of concentrations of free light chains of serum immunoglobulins and cerebrospinal fluid with multiple myeloma complicated by tumor myeloradiculopathy. *Gematologiya. Transfuziologiya*. 2016; 2(1): 24–31 (In Russian).
11. Maurer M.J., Cerhan J.R., Katzmann J.A. Monoclonal and polyclonal serum free light chains outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009; 118(10): 2821–6.
12. Moustafa M.A., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. Utility of serum free light chain measurements in multiple myeloma patients not achieving complete response to therapy. *Leukemia*. 2015; 29(10): 2033–8.
13. Dispenzieri A., Kyle R., Merlini G., et al. International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009; 23(2): 215–24.

Information about the authors

Anatoly K. Golenkov*, Dr. Sci. (Med.), Departmental Head, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: golenkov@monikiweb.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6523-9157>

Elena V. Trifonova, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: doctriel@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8132-3378>

Катаева Елена Васильевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: e.kataeva2010@yandex.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2650-7646>

Митина Татьяна Алексеевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: mi_69@inbox.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7493-0030>

Высоцкая Людмила Леонидовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: nora.mila@yandex.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4604-2842>

Черных Юлия Борисовна, старший научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: yulia_chernih@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7271-1560>

Клинушкина Елена Федоровна, врач отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: klyn_81@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8249-5753>

Белоусов Кирилл Александрович, научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: k_bel88@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9028-7671>

Когарко Иветта Николаевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела динамики химико-биологических процессов ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова» РАН,
e-mail: skogarko@yahoo.com;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5065-6249>

Захаров Сергей Геннадьевич, научный сотрудник отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
e-mail: hematologymoniki@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2847-4374>

and Clinical Institute,
e-mail: doctriel@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8132-3378>

Elena V. Kataeva, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: e.kataeva2010@yandex.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2650-7646>

Tatyana A. Mitina, Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: mi_69@inbox.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7493-0030>

Lyudmila L. Vysotskaya, Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: nora.mila@yandex.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4604-2842>

Yulia B. Chernykh, Senior Researcher, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: yulia_chernih@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7271-1560>

Elena F. Klinushkina, Physician, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: klyn_81@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8249-5753>

Kirill A. Belousov, Researcher, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: k_bel88@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9028-7671>

Ivetta N. Kogarko, Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Department of Dynamics of Chemical and Biological Processes, Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
e-mail: skogarko@yahoo.com;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5065-6249>

Sergey G. Zakharov, Researcher, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute,
e-mail: hematologymoniki@mail.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2847-4374>

Караулов Александр Викторович, академик РАН, профессор, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет),
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Когарко Бронислав Станиславович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела динамики химико-биологических процессов ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова» РАН,
e-mail: bkogarko@yahoo.com;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3879-1528>

Марьина Салия Ахсановна, кандидат медицинских наук, руководитель группы гуморального иммунитета ЦКДЛ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» МЗ РФ,
e-mail: maryina.s@blood.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3116-6743>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила 07.12.17

Принята к печати 24.12.2018

Alexander V. Karaulov, Academician of the Russian Academy of Sciences, Prof., Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Clinical Immunology and Allergology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Bronislav S. Kogarko, Cand. Sci. (Phys.- Math.), Senior Researcher, Department of Dynamics of Chemical and Biological Processes, Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
e-mail: bkogarko@yahoo.com;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3879-1528>

Saliya A. Maryina, Cand. Sci. (Med.), Head of the Humoral Immunity Group, National Medical Research Center of Hematology,
e-mail: maryina.s@blood.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3116-6743>

*** Corresponding author**

Received 07 Dec 2017

Accepted 24 Dec 2018

ПРОИЗВОДСТВО КРИОПРЕЦИПИТАТА В РОССИИ: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ

Жибурт Е. Б.^{1*}, Чемоданов И. Г.², Шестаков Е. А.¹

¹ ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 105203, Москва, Россия

² ГБУЗ РК «Центр крови», 295017, Симферополь, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель: определить динамику выпуска криопреципитата организациями службы крови России и сравнить ее с практикой службы крови других стран.

Материалы и методы. Изучены отчеты служб крови России с 1997 по 2017 годы, европейские нормативы заготовки и переливания крови.

Результаты. В 1997–2004 гг. количество выпущенных ежегодно доз криопреципитата колебалось от 263 897 (2000 год) до 297 890 (2002 год) доз. В течение 8 последующих лет количество выпущенных ежегодно доз криопреципитата сокращалось, достигнув исторического минимума в 2012 году — 23 663 дозы. С 2012 по 2017 г. количество ежегодно выдаваемых доз криопреципитата выросло на 80,0 % (до 42 589 доз). Определены причины волнообразной динамики производства криопреципитата в России, а также пути расширения использования этого основного средства коррекции гипофибриногенемии.

Заключение. Необходимо вернуть криопреципитат в арсенал производственной и клинической трансфузиологии, создать российские клинические рекомендации по применению криопреципитата. До разработки национальных рекомендаций оптимально создать правила назначения криопреципитата в каждой организации.

Ключевые слова: криопреципитат, заготовка, переливание, фибриноген, кровотечение, пулирование, инактивация патогенов

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Жибурт Е.Б., Чемоданов И.Г., Шестаков Е.А. Производство криопреципитата в России: прошлое, настоящее и будущее. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 16–20. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-16-20>

CRYOPRECIPITATE PRODUCTION IN RUSSIA: PAST, PRESENT AND FUTURE

Zhiburt E. B.^{1,*}, Chemodanov I. G.², Shestakov E. A.¹

¹ National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, 105203, Moscow, Russian Federation

² Blood Centre, 295017, Simferopol, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To determine the dynamics of cryoprecipitate production in Russian blood service institutions in comparison with such institutions in other countries.

Materials and methods. Reports provided by Russian blood service institutions during the 1997–2017 period were analysed, along with European standards for blood collection and transfusion.

Results. Over the 1997–2004 period, the number of cryoprecipitate units issued annually ranged from 263,897 (2000) to 297,890 (2002) units. Over the subsequent 8 years, the number of annually released cryoprecipitate decreased to 23,663 units, having reached a historical minimum in 2012. From 2012 to 2017, the number of annually issued cryoprecipitate units increased by 80.0 %, reaching the amount of 42,589 units. Reasons for such a wavelike dynamics in cryoprecipitate production in Russia have been determined. In addition, directions for expanding the use of this product in the correction of hypofibrinogenemia have been identified.

Conclusion. Cryoprecipitate should be re-introduced into the practice of clinical transfusiology. To this end, national clinical guidelines for cryoprecipitate application should be developed.

Keywords: cryoprecipitate, production, transfusion, fibrinogen, bleeding, pooling, pathogen inactivation

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Zhiburt E.B., Chemodanov I.G., Shestakov E.A. Cryoprecipitate production in Russia: past, present and future. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 16–20 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-16-20>

Введение

Криопреципитат получают, размораживая свежезамороженную плазму (СЗП) при температуре от 1 до 6 °С, которую затем центрифугируют, ресуспендируют осажденные белки в плазме и повторно замораживают. Эта составляющая плазмы содержит основное количество фактора VIII и фибриногена. Также криопреципитат содержит фактор Виллебранда, фактор XIII и фибронектин [1].

Криопреципитат был предложен J.G Pool в 1965 г. для лечения больных гемофилией А [2]. С появлением препаратов фактора VIII криопреципитат все реже применяют для больных гемофилией. Основное современное направление использования криопреципитата — в качестве источника фибриногена. Также

криопреципитат используют для коррекции дефицита фактора Виллебранда и дефицита фактора XIII.

Цель: определить динамику выпуска криопреципитата организациями службы крови России, сопоставить ее с практикой службы крови других развитых стран.

Материалы и методы

Изучены отчеты служб крови России [2–12] и США [13], европейские нормативы заготовки и переливания крови [14, 15].

Результаты и обсуждение

В 1997–2004 гг. количество выпущенных ежегодно доз криопреципитата колебалось от 263 897 (2000 год)

до 297 890 (2002 год) доз. В течение 8 последующих лет количество выпущенных ежегодно доз криопреципитата сокращалось, достигнув исторического минимума в 2012 году — 23 663 дозы (рис. 1).

С 2012 по 2017 г. количество ежегодно выдаваемых доз криопреципитата выросло на 80,0 % (до 42 589 доз) (рис. 1).

Обсуждение

Можно выделить несколько причин снижения выпуска и потребления криопреципитата:

- 1991–2009 гг. криопреципитат в России ошибочно классифицировали как лекарственный препарат, требующий соответствующей лицензии на производство лекарственных средств (что практически невозможно для организации, лицензированной только для медицинской деятельности) [16];

- с 2005 г. все российские больные гемофилией обеспечены лекарственными концентратами факторов свертывания крови [17, 18];

- в нормативных документах дозу криопреципитата рекомендовано рассчитывать по концентрации фактора VIII [19, 20], не принимая в расчет концентрацию фибриногена.

С 2012 по 2017 г. количество ежегодно выдаваемых доз криопреципитата выросло на 80,0 % (до 42 589 доз) (рис. 1). Можно выделить несколько причин увеличения выпуска и потребления криопреципитата:

- в 2010 г. криопреципитат реквалифицирован как компонент крови [21], который могут выпускать все организации, имеющие лицензию на медицинскую деятельность по заготовке крови;

- появляется все больше данных о ключевой роли фибриногена в патогенезе коагулопатии у больных с массивной кровопотерей [22];

- в отсутствие концентрата фибриногена криопреципитат является средством выбора коррекции гипофибриногенемии [23].

В Национальном медико-хирургическом центре имени Н.И. Пирогова больным с кровотечением и концентрацией фибриногена менее 1 г/л вводят 5 доз криопреципитата с последующим клинико-лабораторным мониторингом [1].

Согласно Европейским рекомендациям по лечению массивных кровотечений и коагулопатий при травме [24], пострадавшим с массивным кровотечением и доказанным снижением концентрации фибриногена плазмы менее 1,5–2,0 г/л или дефицитом функционального фибриногена, подтвержденным с помощью вискоэластичных методов (тромбоэластометрии, тромбоэластографии), рекомендуется вводить 3–4 г концентрата фибриногена или 15–20 доз криопреципитата.

Столь множественное донорское воздействие на реципиента побудило службу крови Великобритании [15] внедрить в практику пулированный патогенредуцированный лейкодеплецированный криопреципи-

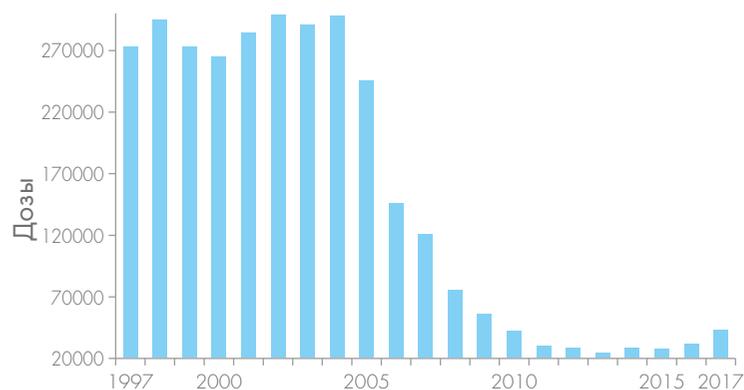


Рисунок 1. Ежегодная выдача криопреципитата Службой крови России
Figure 1. Annual production of cryoprecipitate by Russian blood service institutions

тат. Его готовят из 6 доз лейкодеплецированной плазмы, патогенредуцированной метиленовым синим. Конечный его объем составляет от 100 до 300 мл, содержание фибриногена — более 700 мг. При этом донор должен жить в государстве, где не зарегистрирована болезнь Крейтцфельдта — Якоба, быть мужчиной либо женщиной, в крови которых отсутствуют HLA/HNA-антитела.

В Европе допустимо выделять криопреципитат как из патогенредуцированной, так и из необработанной плазмы. При этом отмечают, что инактивация патогенов обычно снижает риск передачи оболочечных вирусов, например ВИЧ, вирусов гепатитов В и С, в десять тысяч раз [14].

С 2013 по 2015 гг. количество выданных в клиники США доз криопреципитата выросло на 89,9 % (с 978 до 1857 тысяч доз). В этот же период количество выданных доз плазмы сократилось на 14,4 % (с 4338 до 3714 тысяч доз) [13].

Качество российского криопреципитата высокое: регламентированное минимальное содержание фибриногена в дозе криопреципитата составляет 140 мг, а реально среднее содержание — более 300 мг [25].

Затрудняют переливание криопреципитата два регламентированных условия: а) выполнения трехэтапной биологической пробы и б) оставления в гемоконтейнере 5 мл трансфузионной среды, что может составить до 50 % объема криопреципитата. В отношении последнего следует отметить, что авторам статьи за несколько десятилетий практической трансфузиологии эти 5 мл негодились ни разу.

Эти проблемы легко решаются внедрением мировой практики: а) биологическая проба — трансфузия первых 15 мл со скоростью 2 мл в минуту, без перерывов [26]; б) пулированный патогенредуцированный криопреципитат.

Таким образом, необходимо вернуть криопреципитат в арсенал производственной и клинической трансфузиологии, создать российские клинические рекомендации по применению криопреципитата.

Для широкого использования криопреципитата необходима модернизация технологий его получения, воля и интеллектуальное сопровождение его клинического

применения. До разработки национальных рекомендаций оптимально создать правила назначения криопреципитата в каждой организации.

Литература

1. Жибурт Е.Б. Гемоконпонентная терапия. М.: Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова, 2017. 62 с.
2. Pool J.G. Cryoprecipitated factor VIII concentrate. *Thromb Diath Haemorrh Suppl.* 1968; 35: 35–40.
3. Степанова И.П., Белов Е.В., Селиванов Е.А., Данилова Т.Н. Производственная трансфузиология России на современном этапе. *Трансфузиология.* 2000; 1(1): 6–27.
4. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н. Служба крови России в 2001 году. *Трансфузиология.* 2002; 3(4): 7–30.
5. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Быстров М.В. Служба крови России в 2003 году. *Трансфузиология.* 2004; 5(4): 7–36.
6. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н. Служба крови России в 2005 году. *Трансфузиология.* 2006; 7(3): 4–43.
7. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н. Характеристика деятельности учреждений службы крови России в 2007 году. *Трансфузиология.* 2008; 9(3): 4–27.
8. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н. Служба крови России: современное состояние и перспективы развития. *Трансфузиология.* 2010; 11(3): 4–31.
9. Селиванов Е.А., Четкин А.В., Григорьян М.Ш. Современное состояние донорства крови и ее компонентов в Российской Федерации. *Трансфузиология.* 2012; 12(3): 4–13.
10. Четкин А.В., Григорьян М.Ш., Макеев А.Б. Служба крови России в 2012 году. *Трансфузиология.* 2013; 14(3): 4–15.
11. Четкин А.В., Данильченко В.В., Григорьян М.Ш. Основные итоги деятельности службы крови Российской Федерации в 2015 году. *Трансфузиология.* 2016; 17(3): 4–13.
12. Четкин А.В., Данильченко В.В., Григорьян М.Ш. и др. Основные показатели деятельности службы крови Российской Федерации в 2017 году. *Трансфузиология.* 2018; 19(3): 4–14.
13. Жибурт Е.Б., Губанова М.Н., Гайворонская В.В. и др. Развитие службы крови США. *Трансфузиология.* 2017; 18(3): 86–91.
14. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 19th edn. Council of Europe Publishing, Strasbourg. 2017. 545 p.
15. Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom. 8th edition, 2013. Available at: <http://www.transfusionguidelines.org/red-book/publication-information>
16. Жибурт Е.Б. Обращение компонентов и препаратов крови. *Ремедиум.* 2004; 11: 56–7.
17. Программное лечение заболеваний системы крови: сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. М.: Практика; 2006. 515 с.
18. Постникова Н.С. Правовые аспекты лечения орфанных заболеваний по программе «Семь нозологий». *Правовые вопросы в здравоохранении.* 2013; 6: 14–25.
19. Приказ Минздрава России от 25.11.2002 № 363 «Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови».
20. Приказ Минздрава России от 02.04.2013 № 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов».

References

1. Zhiburt E.B. Blood component therapy. Moscow: Pirogov National Medical Surgical Center, 2017. 62 p. (In Russian).
2. Pool J.G. Cryoprecipitated factor VIII concentrate. *Thromb Diath Haemorrh Suppl.* 1968; 35: 35–40.
3. Stepanova I.P., Belov E.V., Selivanov E.A., Danilova T.N. Production transfusiology of Russia at the present stage. *Transfuziologiya.* 2000; 1(1): 6–27 (In Russian).
4. Selivanov E.A., Danilova T.N., Degtereva I.N. Russian blood service in 2001. *Transfuziologiya.* 2002; 3(4): 7–30 (In Russian).
5. Selivanov E.A., Danilova T.N., Bystrov M.V. Russian blood service in 2003. *Transfuziologiya.* 2004; 5(4): 7–36 (In Russian).
6. Selivanov E.A., Danilova T.N., Degtereva I.N. Russian blood service in 2005. *Transfuziologiya.* 2006; 7(3): 4–43 (In Russian).
7. Selivanov E.A., Danilova T.N., Degtereva I.N. Characteristics of the activities of blood institutions of Russia in 2007. *Transfuziologiya.* 2008; 9(3): 4–27 (In Russian).
8. Selivanov E.A., Danilova T.N., Degtereva I.N. Russian blood service: current state and development prospects. *Transfuziologiya.* 2010; 11(3): 4–31 (In Russian).
9. Selivanov E.A., Chechetkin A.V., Grigor'yan M.Sh. The current state of blood donation and its components in the Russian Federation. *Transfuziologiya.* 2012; 12(3): 4–13 (In Russian).
10. Chechetkin A.V., Grigor'yan M.Sh., Makeev A.B. Russian blood service in 2012. *Transfuziologiya.* 2013; 14(3): 4–15 (In Russian).
11. Chechetkin A.V., Danil'chenko V.V., Grigor'yan M.Sh. The main results of the activities of the blood service of the Russian Federation in 2015. *Transfuziologiya.* 2016; 17(3): 4–13 (In Russian).
12. Chechetkin A.V., Danil'chenko V.V., Grigor'yan M.Sh., et al. Key performance indicators of the blood service of the Russian Federation in 2017. *Transfuziologiya.* 2018; 19(3): 4–14 (In Russian).
13. Zhiburt E.B., Gubanov M.N., Gajvoronskaya V.V., et al. The development of the US blood service. *Transfuziologiya.* 2017; 18(3): 86–91 (In Russian).
14. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 19th edn. Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2017. 545 p.
15. Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom. 8th edition, 2013. Available at: <http://www.transfusionguidelines.org/red-book/publication-information>
16. Zhiburt E.B. Circulation of blood components and products. *Remedium.* 2004; 11: 56–7 (In Russian).
17. Program treatment of diseases of the blood system: a collection of diagnostic algorithms and protocols for the treatment of diseases of the blood system. Savchenko V.G., ed. Moscow: Praktika, 2006 (In Russian).
18. Postnikova N.S. Legal aspects of the treatment of orphan diseases under the program “Seven Nosologies”. *Pravovye voprosy v zdravoohranenii.* 2013; 6: 14–25 (In Russian).
19. Order No 363 of 25 November 2012 of the Ministry of Health of the Russian Federation “Approving the Instruction for Use of Blood Components” (In Russian).
20. Order No 183n of 02 April 2013 of the Ministry of Health of the Russian Federation “Approval of the regulations of the clinical use of the donor blood and (or) its components” (In Russian).

21. Постановление Правительства РФ от 26.01.2010 № 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии».
22. Lunde J., Stensballe J., Wikkels A., Johansen M., Afshari A. Fibrinogen concentrate for bleeding — a systematic review. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2014; 58(9): 1061–74.
23. Галстян Г.М., Берковский А.Л., Журавлев В.В. и др. Нужны ли в России препараты фибриногена? *Анестезиология и реаниматология.* 2014; 3: 49–59.
24. Rossaint R., Bouillon B., Cerny V., et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit. Care.* 2016; 20: 100.
25. Султанбаев У.С., Аюпова Р.Ф., Салихова А.К., Жибурт Е.Б. Об адекватности контроля качества криопреципитата. *Трансфузиология.* 2016; 17(3): 41–6.
26. Губанова М.Н., Шихмирзаев Т.А., Жибурт Е.Б. Особенности национальной биологической пробы при переливании крови. *Менеджер здравоохранения.* 2016; 6: 53–9.

Информация об авторах

Жибурт Евгений Борисович*, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой трансфузиологии, ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: ezhiburt@yandex.ru, тел.: +7 (495) 211-79-51;
105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70.
ORCID: [http:// orcid.org/0000-0002-7943-6266](http://orcid.org/0000-0002-7943-6266)

Чемоданов Игорь Геннадьевич, главный врач, ГБУЗ РК «Центр крови» Республики Крым,
e-mail: gbuz.rk.ck@yandex.ru, тел.: +7 (3652) 27-87-45;
295017, г. Симферополь, ул. Киевская, 37/2
ORCID: [http:// orcid.org/0000-0002-9159-6254](http://orcid.org/0000-0002-9159-6254)

Шестаков Евгений Андреевич, доцент, доктор медицинских наук, профессор кафедры трансфузиологии, ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: sheugeny@mail.ru, тел.: +7 (499) 464-46-63;
105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1214-4493>

* Автор, ответственный за переписку

Поступила 10.10.2018

Принята к печати 24.12.2018

21. Decision No. 29 of the Government of the Russian Federation of 26 January 2010 “About approving the technical regulation concerning safety of the blood, blood products, blood substituting solutions and technological means used in transfusion and infusion therapy” (In Russian).
22. Lunde J., Stensballe J., Wikkelsø A., et al. Fibrinogen concentrate for bleeding — a systematic review. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2014; 58(9): 1061–74.
23. Galstyan G.M., Berkovskij A.L., Zhuravlev V.V., et al. Are fibrinogen preparations necessary in Russia? *Anesteziologiya i reanimatologiya.* 2014; 3: 49–59 (In Russian).
24. Rossaint R., Bouillon B., Cerny V., et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit. Care.* 2016; 20: 100.
25. Sultanbaev U.S., Ayupova R.F., Salihova A.K., Zhiburt E.B. On the adequacy of the quality control of cryoprecipitate. *Transfuziologiya.* 2016; 17(3): 41–6 (In Russian).
26. Gubanova M.N., Shihmirzaev T.A., Zhiburt E.B. Features of the national biological sample during blood transfusion. *Menedzher zdravooхранeniya.* 2016; 6: 53–9 (In Russian).

Information about the authors

Evgeny B. Zhiburt *, Dr. Sci. (Med.), Prof., Departmental Head, Department of Transfusiology, National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, e-mail: ezhiburt@yandex.ru, tel. : +7 (495) 211-79-51;
105203, Moscow, Nizhnaya Pervomaiskaya str., 70.
ORCID: [http:// orcid.org/0000-0002-7943-6266](http://orcid.org/0000-0002-7943-6266)

Igor G. Chemodanov, Chief Medical Officer, Blood Center, Republic of Crimea, e-mail: gbuz.rk.ck@yandex.ru, тел.: +7 (3652) 27-87-45;
295017, Simferopol, Kievskaya str., 37/2
ORCID: [http:// orcid.org/0000-0002-9159-6254](http://orcid.org/0000-0002-9159-6254)

Evgeny A. Shestakov, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of Transfusiology, National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, e-mail: sheugeny@mail.ru, тел.: +7 (499) 464-46-63;
105203, Moscow, Nizhnaya Pervomaiskaya str., 70.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1214-4493>

* Corresponding author

Received 10 Oct 2018

Accepted 24 Dec 2018

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-21-34>

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА DSP30 В СОЧЕТАНИИ С ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2 ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Кислицына М. А.^{*}, Обухова Т. Н., Алимова Г. А., Шишигина Л. А., Гребенюк Л. А., Абрамова Т. В., Горячева С. Р., Моисеева Т. Н.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель работы — оценить эффективность использования DSP30 в сочетании с IL2 при культивировании клеток крови/костного мозга/лимфоузла больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) для выявления клональных нарушений кариотипа.

Материалы и методы. В исследование были включены 50 больных ХЛЛ. Всем больным выполнено стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) (46 больных — с DSP30 + IL2 и LPS + TPA; 4 больных — только с DSP30 + IL2) и FISH с ДНК-зондами для выявления трисомии 12, делеций 13q14, 11q22, 17p13.

Результаты. При культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA СЦИ успешно выполнено 41 (82 %) и 38 (83 %) больным: aberrantный кариотип — у 36 (72 %) и 15 (33 %), комплексные нарушения кариотипа — у 13 (26 %) и 5 (11 %) соответственно. Выявлено достоверное различие между количеством метафаз с хромосомными аномалиями, полученными при культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA ($V = 490,5$, $p < 0,05$). У 6 больных при СЦИ выявлены сбалансированные транслокации, у 4 из них — с вовлечением локуса IgH/14q32, подтвержденные FISH, у 11 — несбалансированные транслокации, у 6 — сочетания транслокаций. В 5 случаях выявленные при FISH делеции 13q14, 11q22, 17p13 по результатам СЦИ сопровождалась сбалансированными/несбалансированными транслокациями в этих локусах. Несбалансированная $t(12;16)(q14;q23)$ — случай частичной трисомии — выявлена только при культивировании с DSP30 и IL2.

Заключение. Частота выявления aberrantного кариотипа у больных ХЛЛ более чем в два раза выше при культивировании с DSP30 + IL2, чем с LPS + TPA. СЦИ является важным методом, позволяющим уточнять структуру хромосомных нарушений, в частности выявлять транслокации и выделять группу больных самого высокого риска ХЛЛ — с комплексными нарушениями кариотипа для определения тактики их лечения.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, стандартное цитогенетическое исследование, комплексный кариотип, олигонуклеотид DSP30, интерлейкин-2

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Кислицына М.А., Обухова Т.Н., Алимова Г.А., Шишигина Л.А., Гребенюк Л.А., Абрамова Т.В., Горячева С.Р., Моисеева Т.Н. Эффективность использования олигонуклеотида DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 для выявления хромосомных aberrаций у больных хроническим лимфолейкозом. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 21–34. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-21-34>

EFFICACY OF OLIGONUCLEOTIDE DSP30 IN COMBINATION WITH INTERLEUKIN-2 FOR THE DETECTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Kislitsyna M. A., Obukhova T. N., Alimova G. A., Shishigina L. A., Grebenyuk L. A., Abramova T. V., Goryacheva S. R., Moiseeva T. N.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the efficacy of DSP30 in combination with IL2 in cultivating blood cells/bone marrow/lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients to detect clonal abnormalities.

Materials and methods. The study included 50 patients with CLL, all of whom underwent both chromosome banding analysis (CBA) (46 patients with DSP30+IL2 and LPS+TPA; 4 patients with only DSP30+IL2) and FISH with DNA probes to detect trisomy 12 and deletions of 13q14, 11q22 and 17p13.

Results. Under cell cultivation with DSP30+IL2 and LPS+TPA, CBA was successfully performed in 41 (82 %) and 38 (83 %) patients. Chromosome aberrations were observed in 36 (72 %) and 15 (33%) cases, while a complex karyotype was detected in 13 (26%) and 5 (11%) cases, respectively. A significant difference was found between the number of metaphases with chromosomal abnormalities obtained by cultivation with DSP30+IL2 and LPS+TPA ($V = 490.5$, $p < 0.05$). CBA revealed balanced translocations in 6 patients, with the involvement of the IgH/14q324 locus being confirmed in 4 cases. Unbalanced translocations and various combinations of translocations were detected in 11 and 6 patients, respectively. In 5 cases, according to CBA, the results of 13q14, 11q22, 17p13 deletions identified by FISH were accompanied by balanced or unbalanced translocations in these loci. Unbalanced $t(12;16)(q14;q23)$ — a case of partial trisomy — was detected only by CBA with DSP30+IL2.

Conclusions. An abnormal karyotype was detected in CLL patients twice as more frequently under cultivation with DSP30+IL2 compared to LPS+TPA. CBA is an important method allowing the structure of chromosomal abnormalities to be specified and translocations to be identified. As a result, patients running the highest risk of CLL — those with a complex karyotype — can be singled out for selecting an optimal strategy of their management.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia (CLL), chromosome banding analysis (CBA), complex karyotype, CpG-oligonucleotide DSP30, interleukin-2

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Kislitsyna M.A., Obukhova T.N., Alimova G.A., Shishigina L.A., Grebenyuk L.A., Abramova T.V., Goryacheva S.R., Moiseeva T.N. Efficacy of oligonucleotide DSP30 in combination with Interleukin-2 for the detection of chromosomal aberrations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 21–34 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-21-34>

Введение

На долю хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) приходится около четверти случаев всех лейкозов и неходжкинских лимфом среди взрослого населения европейских стран [1]. ХЛЛ отличается гетерогенностью клинических проявлений — от бессимптомного

или медленно прогрессирующего до агрессивного течения с показаниями к началу специфической терапии [1, 2]. Для стратификации больных на группы риска и определения подходов к лечению применяются различные параметры: системы стадирования по Binet

и Rai, возраст, время удвоения абсолютного количества лимфоцитов, концентрация $\beta 2$ -микроглобулина, экспрессия CD38 и ZAP70, мутации генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (мутационный статус) и цитогенетические нарушения [1, 3]. В клинической практике используется международный прогностический индекс (МПИ, CLL-IPI), для которого необходимо исследование делеции 17p13/TP53. Однако, согласно рекомендациям международной рабочей группы по исследованию ХЛЛ (iwCLL), для оценки прогноза важно использовать данные о других генетических нарушениях [1].

Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зондов к локусам известных хромосомных aberrаций позволяет выявлять хромосомные нарушения у 80 % больных ХЛЛ. Наиболее часто встречающимися хромосомными aberrациями являются делеция 13q14 — 51–57 % случаев, делеция 11q22/ATM — 12–20 %, трисомия хромосомы 12 — 16 %, делеция 17p13/TP53 — 7 % [4, 5]. В 2000 г. Döhner и соавт. [5] предложили иерархическую прогностическую модель ХЛЛ на основании анализа общей выживаемости больных с характерными хромосомными aberrациями, выявленных при FISH-исследовании. Медиана общей выживаемости в группе с делецией 17p составила 32 месяца, с делецией 11q — 79 месяцев, с трисомией хромосомы 12 — 114 месяцев, с отсутствием aberrации — 111 месяцев, с изолированной делецией 13q — 133 месяца [5]. На сегодняшний день иерархическая модель ХЛЛ сохраняет свою актуальность [6]. Однако изменения кариотипа при ХЛЛ не ограничиваются этими хромосомными нарушениями.

Выявление хромосомных aberrаций при ХЛЛ с помощью стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) затруднено в связи с крайне низкой митотической активностью опухолевых В-лимфоцитов [7]. Применение стандартных стимуляторов деления В-лимфоцитов, таких как липополисахарид (LPS) и 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТРА), значительно увеличивает количество делящихся опухолевых клеток. Клональные хромосомные aberrации выявляются не более чем у половины больных [7–9].

В исследованиях Decker и соавт. [10] было показано иммуностимулирующее влияние на деление клеток ХЛЛ CpG-олигонуклеотида DSP30 за счет активации внутриклеточных сигнальных путей, приводящей к пролиферации опухолевых В-клеток, продукции цитокинов, секреции иммуноглобулина на поверхности клетки и экспрессии таких молекул, как CD25, CD80, CD86. Увеличение на мембране клеток ХЛЛ костимулирующих молекул CD80, CD86 приводит к активации Т-лимфоцитов, которые способствуют формированию специфического микроокружения опухолевых В-лимфоцитов [11]. Молекула CD25 представляет

собой переменный домен комплекса рецептора к интерлейкину-2 и определяет высокое сродство к этому цитокину. Добавление интерлейкина-2 (IL-2) при стимуляции клеток CpG-олигонуклеотидом DSP30 усиливает пролиферацию клеток ХЛЛ [10, 12].

В ряде клинических исследований была показана эффективность использования сочетания CpG-DSP30 и IL-2 в качестве стимулятора деления В-лимфоцитов для исследования кариотипа больных ХЛЛ [4, 13]. В исследовании Haferlach и соавт. [4] при стимулировании DSP30 и IL-2 СЦИ успешно выполнено 98 % больным, из них aberrантный кариотип выявлен в 83 % случаев и комплексные нарушения кариотипа (3 и более хромосомных нарушения) обнаружены в 21 % случаев. Результаты наших предыдущих исследований и данные литературы свидетельствуют о независимом неблагоприятном прогностическом значении комплексных нарушений кариотипа [9, 14, 15].

Наличие делеции 17p13/TP53 является неблагоприятным прогностическим фактором. Потеря гена TP53, выявляемая при FISH-исследовании у больных ХЛЛ, коррелирует с коротким временем до начала терапии, низкой общей выживаемостью и резистентностью к стандартной иммунохимиотерапии [16–18]. Применение новых таргетных препаратов, таких как ибрутиниб и венетоклак, улучшает эффективность лечения больных с делецией 17p13 [19–21]. В ряде исследований показана высокая ассоциация делеции 17p с комплексным кариотипом: в 65–80 % случаев делеция 17p выявляется в составе комплексного кариотипа [4, 14]. Однако в исследовании Thompson и соавт. [14] многофакторный анализ результатов лечения ибрутиниб-содержащими схемами больных с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ показал независимое негативное влияние на бессобытийную и общую выживаемость комплексного кариотипа вне зависимости от наличия делеции 17p, выявленной при FISH-исследовании. В работе Anderson и соавт. [22] показано, что комплексный кариотип является доминирующим фактором риска прогрессии ХЛЛ у больных при лечении венетоклаксом.

Ряд исследователей выделяет в отдельную группу риска больных ХЛЛ с выявленными при кариотипировании транслокациями [15, 23, 24]. В работе Maug и соавт. [25] впервые было показано, что наличие любых транслокаций неблагоприятно влияет на течение ХЛЛ. Транслокации встречаются примерно у 30 % больных ХЛЛ как в составе комплексного кариотипа, так и в виде единственного нарушения [15, 23, 24]. В кариотипе они могут быть представлены в виде сбалансированных и несбалансированных транслокаций. [26]. В составе комплексного кариотипа чаще встречаются несбалансированные транслокации. В исследовании Rigolin и соавт. [24] было выявлено, что несбалансированные транслокации влияют

на общую выживаемость и время до начала терапии у больных ХЛЛ.

Особое внимание среди сбалансированных перестроек занимают транслокации с вовлечением генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGH*) в регионе 14q32. Данные транслокации встречаются в 5–7 % случаев ХЛЛ и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом. По мнению авторов, больные с транслокациями *IGH* представляют собой отдельную группу с морфологическими особенностями, такими как плазматизация цитоплазмы опухолевых лимфоцитов и наличие пролимфоцитов [26–28].

Таким образом, актуальным остается исследование кариотипа больных ХЛЛ для изучения спектра и частоты встречаемости отдельных хромосомных аномалий и выявления комплексных нарушений кариотипа для формирования групп риска и разработки индивидуальных подходов к лечению.

Целью настоящей работы являлась оценка эффективности использования DSP30 в сочетании с IL2 при культивировании клеток крови/костного мозга/лимфоузла больных ХЛЛ для выявления клональных нарушений кариотипа.

Материалы и методы

В исследование включены 50 больных ХЛЛ, наблюдавшихся в ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России в период с марта 2016 по декабрь 2017 г.: 34 мужчины и 16 женщин в возрасте от 35 до 86 лет (медиана возраста — 58 лет). Диагноз ХЛЛ был установлен на основании данных проточной цитометрии. На опухолевых клетках выявлялась экспрессия CD5, CD19, CD23, слабая экспрессия CD20 и поверхностного иммуноглобулина. СЦИ и флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) выполнены 31 больному до начала терапии и 19 больным, получавшим лечение, с резистентным и рецидивирующим течением заболевания. Всем 50 больным выполнено СЦИ и FISH.

СЦИ. При культивировании в 39 случаях исследовали клетки периферической крови, в 10 — клетки костного мозга, в 1 — клетки биоптата лимфоузла. Клетки культивировали в питательной среде RPMI 1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки в соотношении 4:1, L-глутамин в конечной концентрации 0,584 мг/мл, антибиотика гентамицина в конечной концентрации 0,28 мг/мл с двумя комбинациями митогенов: (1) DSP30 + IL2 — иммуностимулятором деления олигонуклеотидом DSP30 в конечной концентрации 2 нмоль/мл (TibMolBiol, Германия) и 200 Ед/мл интерлейкином-2 (IL2, Sigma-Aldrich, США) (DSP30 + IL2); (2) LPS + TPA — стимулятором деления В-лимфоцитов липополисахаридом LPS *E.coli* (SIGMA, США) в конечной концентрации 0,01 мг/мл и TPA в конечной концентрации 0,01 нг/мл (SIGMA, США). Культивировали при температуре

37 °С в течение 72 часов, последние 17 часов с добавлением колцемида (CarugoMAX, Gibco, США) 0,15 г/мл среды. Обработку гипотоническим раствором, фиксацию клеток и приготовление препаратов хромосом проводили по стандартной методике. 46 больным были выполнены 2 серии постановки культур, 4 больным — только с DSP30 и IL2. G-дифференциальную окраску хромосом осуществляли по методике Seabright, 1971 г. [29] с модификациями. Кариотип описывали в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой ISCN, 2016 [30]. По возможности анализировали 20 метафаз.

FISH. Мононуклеары периферической крови (костного мозга) выделяли на градиенте плотности 1,077 раствора Lympho Separation Medium (LSM, “ISN Biomedicals”). При FISH-анализе исследовали мононуклеары периферической крови у 48 больных, костного мозга — у одного больного, клетки биоптата лимфоузла — у одного больного. В работе использовали многоцветный зонд: P53(TP53)/ATM and D13S319/13qter/12cen CLL PROFILER Kit (“Aquarius@Cytocell”, Великобритания). Для подтверждения перестройки локуса гена тяжелой цепи Ig (14q32) 4 больным использовали ДНК-зонд: Vysis LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott, США). Для подтверждения перестройки локуса гена легкой цепи (2p11) 1 больному выполнено FISH-исследование с ДНК-зондом XL 2p11 IGK BA Break Apart Probe (Metasystems, США).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программы для статистической обработки данных R 3.5.0 (Lucent Technologies, США) и Excel 2016 (Microsoft, США). Для сравнения результатов кариотипирования двух серий культур с DSP30 + IL2 и LPS + TPA применяли парный тест Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В результате культивирования с DSP30 + IL2 СЦИ успешно выполнено 41 (82 %) больному (табл. 1). Аберрантный кариотип выявлен у 36 (72 %) больных: у 15 (30 %) из них была найдена одна аберрация, у 8 (16 %) — две и у 13 (26 %) — три или более аберраций (комплексные нарушения кариотипа) (рис. 1). Нормальный кариотип выявлен у 5 (10 %) больных, но у 3 из них при FISH-исследовании были выявлены аберрации: у 2 — делеция 13q, у одного — делеция 11q (табл. 3, № 14, 31, 40). В одном случае при отсутствии митозов в культуре с DSP30 + IL2 хромосомные нарушения были выявлены при культивировании с LPS + TPA (табл. 3, № 48).

При культивировании с LPS + TPA кариотипирование успешно выполнено 38 (83 %) больным (табл. 1). Аберрантный кариотип в культуре с LPS + TPA

Таблица 1. Результаты культивирования опухолевых клеток с DSP30 + IL2 и LPS + TPA у больных ХЛЛ
Table 1. Cultivation of tumour cells with DSP30 + IL2 and LPS + TPA in patients with CLL

Стимуляторы деления B-cell division stimulators	Количество больных Number of patients	Наличие митозов, количество больных (%) Presence of mitoses, number of patients, (%)	Аберрантный кариотип, количество больных (%) Aberrant karyotype, number of patients (%)	Комплексный кариотип, количество больных (%) Complex karyotype, number of patients (%)
DSP30 + IL2	50	41 (82)	36 (72)	13 (26)
LPS + TPA	46	38 (83)	16 (35)	5 (11)

Таблица 2. Частота хромосомных нарушений, выявленных при культивировании DSP30 + IL2, LPS + TPA и методом FISH у больных ХЛЛ
Table 2. Frequency of chromosomal abnormalities detected by the cultivation of DSP30 + IL2, LPS + TPA and the FISH method in patients with CLL

Хромосомные нарушения Chromosomal abnormalities	DSP30 + IL2, количество больных (%) DSP30 + IL2, number of patients (%)	LPS + TPA, количество больных (%) LPS + TPA, number of patients (%)	FISH, количество больных (%) FISH, number of patients (%)
del(11)(q22)	13 (26)	6 (13)	17 (34)
Трисомия 12 Trisomy 12	8 (16)	4 (8)	7 (14)
del(13)(q14)	7 (14)	2 (4)	19 (38)
del(17)(p13)	7 (14)	4 (8)	9 (18)
Комплексный кариотип Complex karyotype	13 (26)	5 (11)	2 (4)

выявлен только в 16 (35 %) случаях: в 7 (15 %) из них найдена одна аберрация, в 4 (9 %) — две и в 5 (11 %) — комплексные нарушения кариотипа (рис. 1). Нормальный кариотип выявлен у 22 (48 %) больных, но у 14 из них при культивировании с DSP30 + IL2 были выявлены аберрации. У 14 (28 %) больных с нормальным

кариотипом в культуре с LPS + TPA при культивировании с DSP30 + IL2 выявлены клональные хромосомные аберрации: у 4 — комплексные нарушения кариотипа, у 3 — делеция 13q (у одного — с t(13;18)(q14;p11)), у 2 — трисомия 12, у одного — делеция 17p, у одного — делеция 11q и 13q, у одного — делеция 11q, у одного — делеция 6q, у одного — сбалансированная и несбалансированная транслокации с участием хромосомы 8 (табл. 3, № 3, 12, 13, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 37, 39, 41, 42, 49).

У 7 из 14 больных в культуре с LPS + TPA хромосомные аберрации были выявлены только в одной из 20 метафаз (неклональные нарушения), при этом в культуре с DSP30 + IL2 они обнаружены в среднем в 60 % метафаз.

Показано достоверное различие между количеством метафаз с хромосомными аномалиями, полученными при культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA (критерий Вилкоксона, $p = 0,000023$). При FISH-исследовании хромосомные нарушения были выявлены у 41 из 50 больных (82 %): у 32 — одна аберрация, у 7 — 2 аберрации, у 2 — комплексный кариотип.

В группе больных до начала терапии хромосомные аберрации выявлены у 21 из 31 (68 %) больного в культуре с DSP30 + IL2 и у 8 (26 %) в культуре с LPS + TPA. Комплексные нарушения кариотипа в культуре с DSP30 + IL2 выявлены в 5 случаях (16 %), в культуре с LPS + TPA — в одном случае. В группе больных, получающих терапию, у большинства из которых отмечалось рецидивирующее и резистентное течение,

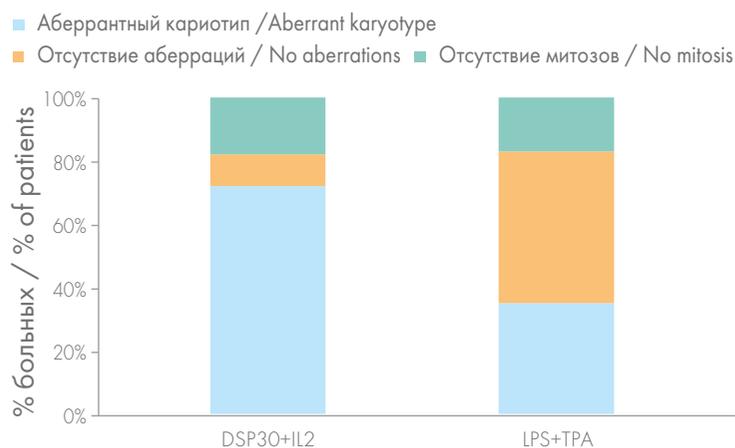


Рисунок 1. Частота выявления аберрантного кариотипа методом СЦИ с использованием двух комбинаций митогенов: DSP30 + IL2 и LPS + TPA у больных ХЛЛ. СЦИ — стандартное цитогенетическое исследование; DSP30 + IL2 — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с олигонуклеотидом DSP30 и с интерлейкином-2; LPS + TPA — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с В-клеточными митогенами LPS и TPA
Figure 1. Frequency of chromosomal aberrations detected by chromosome banding analysis with DSP30 + IL2 and LPS + TPA in CLL patients. All of 50 CLL cases analyzed by chromosome banding analysis: share of patients showing the presence of chromosome abnormalities and the absence of aberrations and mitosis in culture with DSP30+IL2 compared to that with LPS+TPA

Таблица 3. Результаты культивирования с использованием DSP30 + IL2, LPS + TPA и FISH-исследования у больных ХЛЛ
Table 3. Results of chromosome banding analysis using DSP30 + IL2, LPS + TPA and FISH in patients with CLL

№	DSP30 + IL2	LPS + TPA	FISH			
			del 13	del 11	tris 12	del 17
1	47,XY, + 12[19]/45,XY,-3[1]		-	-	+	-
2	46,XX,del(11)(q22)[11]/46,XX[14]		-	+	-	-
3	46,XX, + 12[2]/46,XX[25]	46,XX[5]	-	-	+	-
4	46,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(11)(q22),del(13)(q14q31)[2]/ 47,XX,idem, + mar[12]/47,XX,del(13)(q14q31), + mar[1]/ 46,XX,del(11)(q22),del(13)(q14q31)[1]/46,XX,del(13)(q14q31)[1]/46,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(13)(q14q31)[1]/46,XX[2]	47,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(11)(q22),del(13)(q14q31), + mar[2]/46,XX,del(11)(q22),del(13)(q14q31)[1]/46,XX,del(13)(q14q31), + mar[1]/46,XX[16]	+	+	-	-
5	46,XY,t(6;14)(p21;q32)[19]/46,XY[1]	46,XY,t(6;14)(p21;q32)[19]/46,XY[1]	-	-	-	-
6	41,X,-Y,der(2),add(7)(p21-22),-8,add(8)(p22-23),-9,t(13;21)(q21;q22),-17,add(19)(q13),-22[5]/41,X,-Y,idem,add(1)(p35-36) or t(1;3)(p35-36;p13),-15, + mar[1]	41,X,-Y,der(2),-8,add(8)(p22-23),-9,t(13;21)(q21;q22),-17,add(19)(q13),-22[1]/41,X,-Y,idem,add(7)(p21-22)[4]/36,X,-Y,idem,-3,-4x2,add(7)(p21-22),t(7;11)(q22;p13)-13,-21[1]/31,X,-Y,idem,inv(1)(p36q21)-3,-4,-6,-13x2,-16,-18x2,-19,-20[1]/41,X,-Y,idem,del(5)(q33) or t(5;11)(q33;p14),add(7)(p21-22),add(11)(p14)[1]	-	-	-	+
7	46,XY,del(17)(p11)[6]/46,XY,add(17)(p11)[4]/46,XY,t(14;17)(q10;q10)[1]/45,XY,t(3;7)(q10;p10)[1]/46,XY[8]	45,XY,der(12)t(12;17)(q24;q21),-17[7]/46,XY,del(17)(p11)[4]/46,XY,add(17)(p11)[2]/46,XY[7]	-	-	-	+
8	46,XX,del(13)(q11q14)[4]/46,XX[16]	46,XX,del(13)(q11q14)[3]/46,XX[17]	+	-	-	-
9	[0]	46,XX,t(8;16)(q23;q24)[1]/46,XX[19]	+	-	-	-
10	47,XX,t(9;14)(p13;q31-32), + 12[5]/46,XX[5]	47,XX,t(9;14)(p13;q31-32), + 12[4]/46,XX[16]	-	-	+	-
11	[0]	46,XX[6]	-	-	-	-
12	44,XY,del(3)(p22),-8,-11,add(11)(p14),add(16)(q24),add(17)(p13), + mar[cp3]/45,XY,-11,add(17)(p13)[cp4]/44~45,XY,add(4)(q35),-11,-13,-17, + dic(2;13;17),add(17)(p13),del(17)(p13), + mar[cp6]/46,XY[2]	44,XY,-3,-11,add(11)(p13),add(16)(q24),add(17)(p13)[1]/46,XY[10]	-	-	-	+
13	46,XX,9qh + ,add(11)(q22),del(13)(q14q22)[20]	46,XX,9qh + ,add(11)(q22),del(13)(q14q22)[1]/46,XX[19]	+	+	-	-
14	46,XY,del(13)(q12q14)x2[1]/46,XY[2]	[0]	+6	-	-	-
15	45,X,-Y,del(10)(q24),del(11)(q22),add(13)(q34)[2]/46,XY[28]	45,X,-Y,del(10)(q24),del(11)(q22),add(13)(q34)[1]/46,XY[19]	+6	+	-	-
16	46,XY,der(16)t(12;16)(q14;q23)[6]/46,XY,del(5)(q15q33)[9]/46,XY[5]	46,XY,der(16)t(12;16)(q14;q23)[18]/46,XY[2]	-	-	-	-
17	46,XY,del(13)(q12q14)[4]/46,XY[16]	45,X,-Y,del(13)(q12q14)[1]/46,XY[19]	+	-	-	-
18	[0]	46,XX[20]	+	-	-	-
19	45,XY,1qh + c?,der(2)x2,add(4)(p15-16),-8[3],del(9)(p21) or t(4;9)(p15-16;p21)[cp6]	[0]	-	-	-	-

Продолжение таблицы 3 на с. 27

Продолжение таблицы 3

№	DSP30 + IL2	LPS + TPA	FISH			
			del 13	del 11	tris 12	del 17
20	46,XX,t(2;14)(p14-15;q31-32),der(7)(p12->q36::p13->pter),add(8)(p23),del(11)(q22),-13,+mar or der(13)[9]/46,XX[6]	46,XX[20]	-	+	-	-
21	47,XY,inv(9)(p13q21),del(11)(q22),+12,t(12;18)(q10;p10)[4]	47,XY,inv(9)(p13q21),del(11)(q22),+12,t(12;18)(q10;p10)[1]/47,XY,inv(9)(p13q21),+12[1]/46,XY[3]	+	+	+	-
22	44,XY,add(2)(q37),add(7)(q22) or dup(7)(q11q36),del(8)(q22),der(13)t(13;?) (q21;?),del(14)(q21) or mar,-17,-18,-21,+mar[18]/44,XY,idem,del(1)(q31)[1]/44,XY,t(11;15)(p15;q22),-15,-20[1]	44,XY,add(2)(q37),add(7)(q22) or dup(7)(q11q36),del(8)(q22),der(13)t(13;?) (q21;?),del(14)(q21) or mar,-17,-18,-21,+mar[8]/44,XY,der(11)t(11;15)(p15;q22),-15,-20[1]/46,XY,der(2)t(2;11)(q32;q13)[1]/46,XY[10]	-	-	-	+
23	46,XX,del(6)(q22)[19]/46,XX[1]	46,XX[20]	-	-	-	-
24	46,XY,del(6)(q22),add(17)(p13)[13]/46,XY[2]	46,XY[20]	-	-	-	+
25	46,XX,del(11)(q22)[14]/45,XX,-4,add(8)(p23),del(11)(q22),add(15)(p13)[5]/45,XX,del(3)(q24-25),add(7)(p22) or t(3;7)(q24-25;p22),-10[1]	46,XX,del(11)(q22)[4]/45,XX,-4,add(8)(p23),del(11)(q22),add(15)(p13)[1]/46,XX[15]	-	+	-	-
26	[0]	[0]	-	+	-	-
27	[0]	[0]	-	+	-	-
28	46,XY,del(11)(q22)[14]/46,XY[6]	46,XY,del(11)(q22)[3]/46,XY,t(6;13)(p24;q14),del(11)(q22)[1]/46,XY[16]	-	+	-	-
29	47,XY,+12[14]/46,XY[1]	47,XY,+12[2]/46,XY[8]	+	-	+	-
30	[0]	[0]	+	-	-	-
31	46,XX[8]	46,XX[19]/46,XX,t(7;12)(q22;q24)[1]	-	+	-	-
32	[0]	46,XY[20]	+	-	-	-
33	[0]	46,XX[20]	-	-	-	-
34	46,XY,t(2;7)(q31-32;q36),del(11)(q13)[3]/46,XY[17]	46,XY,t(2;7)(q31-32;q36),del(11)(q13)[2]/47,XY,+mar[1]/45,XY,-13,-14,-20,+mar1+mar2[1]/46,XY[16]	+	+	-	-
35	46,XY,del(11)(q22)[4]/46,XY,4,del(11)(q22),+r(4)(p10q28)[12]/46,XY,-4[1],del(4)(q26q34)[1],del(7)(q11)[1],der(6)add(p25)del(q14)[1],-7[1],del(7)(q22)[1],del(11)(q22)[6],t(11;13)(p15;q21)[1],add(22)(q13)[1],+r(4)(p10q28)[3],+2mar[1][cp7]	46,XY,del(11)(q22)[3]/46,XY,-4,del(11)(q22),+r(4)(p10q28)[4]/46,XY,t(1;7)(q32;q36)[1],-2[1],-4[2],der(6)add(p25)del(q14)[1],-7[1],del(11)(q22)[2],+r(4)(p10q28)[2],+2mar[1][cp3]/46,XY[10]	-	+	-	-
36	46,XY,t(14;19)(q32;q13)[18]/46,XY,del(1)(p31),t(14;19)(q32;q13)[2]	-	-	-	-	+
37	47,XY,+12[12]/46,XY[8]	46,XY[20]	-	-	+	-
38	46,XY,del(11)(q22)[11]/46,XY,del(17)(p11-12),-18[6]/45,XY,der(3),-4,del(17)(p11-12),-18,+mar or ?del(4)(q22)[7]/45,XY,add(2)(q37),del(17)(p11-12),-18[2]/44,XY,-3,-16,del(17)(p11-12),-18,+dic[1]/44,XY,-2,-16,del(17)(p11-12),-18,+dic[1]/46,XY[2]	46,XY,del(11)(q22)[4]/45,XY,der(3),-4,del(17)(p11-12),-18,+mar or ?del(4)(q22)[3]/46,XY[10]	+6	+	-	+

Продолжение таблицы 3 на с. 28

№	DSP30 + IL2	LPS + TPA	FISH			
			del 13	del 11	tris 12	del 17
39	46,XX,add(8)(q24),t(8;10)(q21;p14-15)[10]/46,XX,del(4)(p14)[2]/46,XX[8]	46,XX[20]	+	+	-	-
40	46,XY[20]	46,XY[20]	+	-	-	-
41	46,XY,del(13)(q14q34)[3]/46,XY[7]	46,XY,del(13)(q14q34)[1]/46,XY[9]	+6	-	-	-
42	46,XY,del(11)(q22)[11]/46,XY[9]	46,XY[20]	-	+	-	-
43	46,XY,del(11)(q22)[4]/46,XY[13]	[0]	-	+	-	-
44	[0]	[0]	+6	-	-	-
45	45,XY,-17[9]/45,XY,del(6)(q13),-17[4]/44~45,XY,+3,del(3)(q13),del(3)(p13),del(6)(q13),add(7)(p15),add(9)(p21),del(13)(q12q21),-13x2,-17,-19,+mar[cp2]/44,XY,del(6)(q22),del(9)(p21),-13,-17[2]/42~44,XY,del(1)(q22),-5,-11,-17,-18,-20,+2mar[cp2]/45,XY,t(9;14)(p13;q31-32)[1]	[0]	-	-	-	+
46	43,X,-Y,-6,der(10)t(6;10)(p14;p21),der(21;22)(q10;q10)[20]	-	-	-	-	-
47	46,XY[9]	46,XY[20]	-	-	-	-
48	46,XY[20]	46,XY,del(1)(q31)[11]/46,XY[9]	-	-	-	-
49	46,XY,t(13;18)(q14;p11),add(15)(q26)[4]/46,XY,del(13)(q14q21)[2]/46,XY[14]	46,XY,del(13)(q14q21)[1]/46,XY[19]	+	-	-	-
50	47,XY,+12[6]/48,XY,+5,+12[9]/47,XY,t(1;4)(p31;q33-q34),+12[2]/47,XY,+12,add(19)(q13)[1]/48,XY,+12,+mar[1]/48,XY,+11,+12[1]	47,XY,+12[4]/48,XY,+5,+12[4]/46,XY[9]	-	-	+	-

Примечание. DSP30 + IL2 — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с олигонуклеотидом DSP30 и с интерлейкином-2; LPS + TPA — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с В-клеточными митогенами LPS и TPA; FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*; del 13 — делеция 13q14, 6 — биаллельная делеция 13q14; del 11 — делеция 11q22, tris 12 — трисомия хромосомы 12, del 17 — делеция 17p13.

Note. DSP30+IL2 — cultivation of CLL tumour cells with oligonucleotide DSP30 and Interleukin-2; LPS+TPA — cultivation of CLL tumour cells with B-cell mitogens LPS and TPA; FISH — fluorescence *in situ* hybridization; del 13 — deletion 13q14, b — biallelic deletion 13q14; del 11 — deletion 11q22, tris 12 — trisomy of chromosome 12, del 17 — deletion 17p13.

хромосомные aberrации выявлены у 16 из 19 (84 %) в культуре с DSP30 + IL2 и у 7 (44 %) в культуре LPS + TPA. Комплексные нарушения кариотипа в культуре с DSP30 + IL2 выявлены у 8 (42 %), в культуре с LPS + TPA — у 4 (25 %).

Частота выявления комплексного кариотипа в культуре с DSP30 + IL2 составила 13 (26 %), в культуре с LPS + TPA — 5 (11 %), методом FISH — 2 (4 %) (табл. 2). Из 13 больных с комплексными нарушениями в культуре с DSP30 + IL2 при FISH-исследовании aberrации или не были выявлены (3 случая), или выявлены 1–2 аномалии (8 случаев). Делеция 17p методом FISH определена менее чем у половины больных с комплексными нарушениями кариотипа (5 из 13), у 4 из них изолированно. У 6 из 8 больных с комплексным кариотипом без делеции 17p обнаружена делеция 11q (табл. 2).

При СЦИ были выявлены различные структурные aberrации, не входящие в стандартную диагностическую панель при FISH-исследовании. В 11 случаях

выявлены несбалансированные транслокации, в 6 — сбалансированные транслокации, (в 4 из них — с вовлечением локуса генов *IGH/14q32*), в 6 — сочетания сбалансированных и несбалансированных транслокаций. Несбалансированные транслокации в повторяющихся точках разрыва хромосом (2q, 7p, 8p, 17p, 15q, 19q) чаще выявлялись в составе комплексного кариотипа — 10 из 17 (59 %) случаев. Среди сбалансированных транслокаций кроме транслокаций с вовлечением локуса *IGH/14q32* выявлены следующие: t(1;4)(p31;q33-q34), t(2;7)(q31-32;q36), t(2;12)(q13;p12-13), t(12;18)(q10;p10), t(13;18)(q14;p11), t(13;21)(q21;q22), t(14;17)(q10;q10).

В кариотипе у 4 больных выявлены сбалансированные транслокации, затрагивающие локус генов *IGH* (14q32): t(6;14)(p21;q32), t(9;14)(p13;q31-32), t(2;14)(p14-15;q31-32), t(14;19)(q32;q13) (табл. 3, № 5, 10, 20, 36). Во всех 4 случаях перестройка локуса генов *IGH* подтверждена методом FISH.

У 5 больных выявленные при FISH делеции 13q14, 11q22 и 17p13 по результатам СЦИ сопровождались сбалансированными или несбалансированными транслокациями в этих локусах: у 2 больных в кариотипе выявлены несбалансированные транслокации с вовлечением локусов 11q22 и 17p13 (табл. 3, № 13, 24); у одного больного в разных субклонах выявлены делеция 13q14 и t(13;18)(q14;p11) (табл. 3, № 49); у 2 больных в разных субклонах выявлены различные хромосомные aberrации — делеции, сбалансированные и несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 17p13/TP53 (табл. 3, № 7, 12). У одного больного (табл. 3, № 7) с потерей локуса гена TP53 по результатам FISH-исследования в двух культурах выявлены различные хромосомные aberrации с участием хромосомы 17: в культуре с DSP30 + IL2 выявлена t(14;17)(q10;q10), в культуре с LPS + TPA — несбалансированная t(12;17)(q24;q21) и моносомия 17. У одного больного с трисомией 12, выявленной при FISH-исследовании, одна из хромосом 12 по результатам СЦИ вовлечена в t(12;18)(q10;p10) (табл. 3, № 21). У одного больного при отсутствии трисомии по результатам FISH в культуре с DSP30 + IL2 выявлена несбалансированная t(12;16)(q14;q23) — случай частичной трисомии 12, то есть наличие дополнительного длинного плеча хромосомы 12, подтвержденное при FISH с использованием ДНК-зонда к локусу гена MDM2/12q15 (табл. 3, № 16).

Выявляемость характерных для ХЛЛ хромосомных нарушений методом FISH, методом СЦИ при культивировании с DSP30 + IL2 и методом СЦИ при культивировании с LPS + TPA составила: для делеции 13q14 — 38 % (10 % — биаллельная делеция), 14 и 13 %; для делеции 11q22 — 34, 26 и 4 %; для трисомии 12 — 14, 16 и 8 %; для делеции 17p13 — 18, 14 и 8 %

соответственно. Комплексные нарушения в кариотипе при культивировании с DSP30 + IL2 выявлены у 13 больных (26 %), при культивировании с LPS + TPA — у 5 больных (11 %) и лишь у 2 больных (4 %) при исследовании методом FISH (табл. 2).

Таким образом, при использовании двух методов исследования, СЦИ и FISH, увеличилась частота выявления хромосомных aberrаций. При отсутствии митозов (9 больных) и хромосомных aberrаций (5 больных) при кариотипировании DSP30 + IL2 были определены хромосомные aberrации методом FISH у 10 из них: у 6 — делеция 13q, у 3 — делеция 11q, у одного — делеция 17p (табл. 3, № 9, 14, 18, 26, 27, 30, 31, 32, 40, 44). В 9 случаях отсутствия хромосомных нарушений при FISH-исследовании были выявлены хромосомные нарушения: в культуре с DSP30 + IL2 в 5 случаях и в культуре с LPS + TPA в одном случае, среди них комплексные нарушения кариотипа, t(6;14)(p12;q32), делеция 6q, несбалансированная t(12;16)(q14;q23) и делеция 1q (табл. 3, № 5, 16, 19, 23, 33, 46, 48). На рисунке 2 представлен пример комплексного кариотипа, выявленного при культивировании с DSP30 + IL2 (культивирование с LPS + TPA не проводилось из-за малого количества исследуемого материала). При FISH-исследовании у данного больного хромосомные aberrации не выявлены (табл. 3, № 46).

Обсуждение

СЦИ является важным методом, позволяющим, в отличие от FISH-исследования, анализировать весь кариотип, выявлять диагностические и прогностически значимые хромосомные нарушения и предоставляющим дополнительную информацию о патогенезе

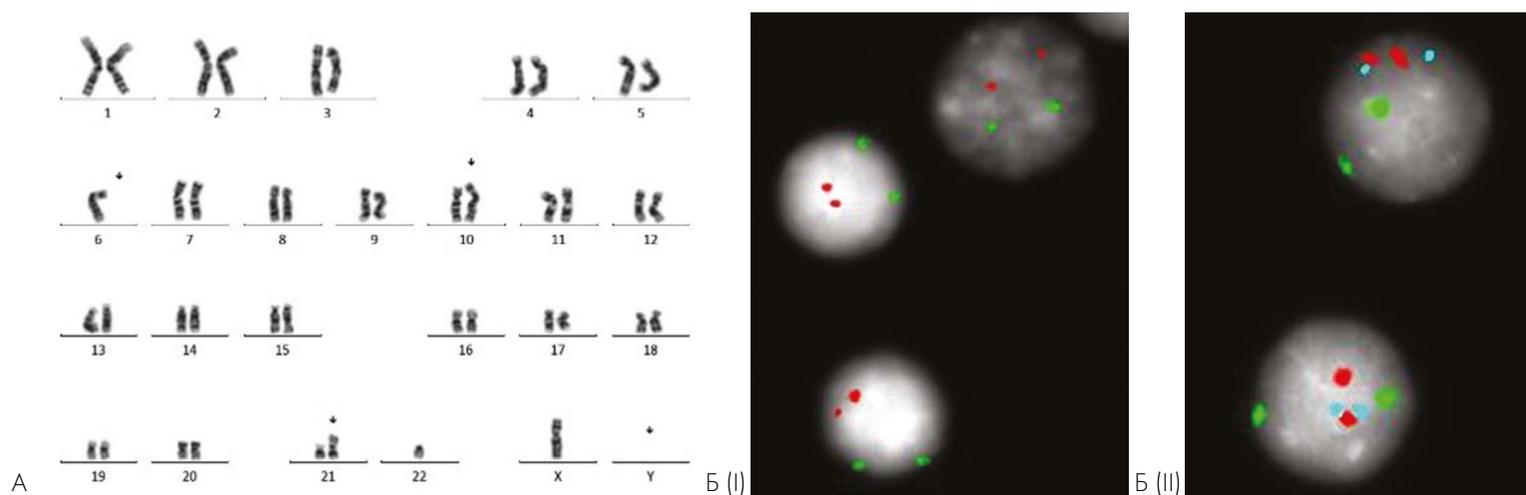


Рисунок 2. Цитогенетическое исследование клеток крови больного ХЛЛ (#46). А — СЦИ с использованием при культивировании DSP30 и IL2. Выявлены комплексные нарушения кариотипа: 43,X,-Y,-6,der(10)t(6;10)(p14;p21),der(21;22)(q10;q10). Б — FISH-исследование с использованием многоцветного зонда к локусам (I) 17p13/TP53 (два красных сигнала), 11q22/ATM (два зеленых сигнала) и (II) 13q14 (два красных сигнала), 13q34/qter (два голубых сигнала) и центромере хромосомы 12 (два зеленых сигнала). Хромосомные нарушения не выявлены

Figure 2. Chromosome banding analysis of peripheral blood cells in a CLL patient (#46). А — CBA was performed using DSP30 and IL2. Karyotyping showed the presence of a complex karyotype: 43,X,-Y,-6,der(10)t(6;10)(p14;p21),der(21;22)(q10;q10). Б — FISH study using multicolor probe to loci (I) 17p13/TP53 (two red signals), 11q22/ATM (two green signals) and (II) 13q14 (two red signals), 13q34/qter (two blue signals) and the centromere of chromosome 12 (two green signals). No chromosomal abnormalities were detected using FISH

опухолевых заболеваний системы крови. Проведение СЦИ у больных ХЛЛ затруднено в связи с низкой митотической активностью опухолевых В-лимфоцитов. СрG-олигонуклеотид DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 обладает способностью стимулировать к делению опухолевые клетки ХЛЛ. Результаты проведенного исследования показали, что эффективность СЦИ у больных ХЛЛ более чем в два раза выше при культивировании с DSP30 и IL2, чем со стандартными В-клеточными митогенами LPS и TPA: аберрантный кариотип выявлен у 36 (72 %) и 16 (35 %) больных соответственно.

Следует отметить, что у 14 больных (28 %) хромосомные аберрации были обнаружены только в культуре с DSP30 + IL2, в то время как в культуре с LPS + TPA у 7 из 14 выявлен нормальный кариотип и еще у 7 неклональные нарушения, то есть хромосомные аберрации выявлены в одной из 20 метафаз. При этом при культивировании с DSP30 + IL2 хромосомные перестройки были выявлены в среднем в 60 % метафаз, что подтверждало клональную природу хромосомных аберраций. В настоящем исследовании показано достоверное различие между количеством метафаз с хромосомными аномалиями, полученными при культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA.

Комплексный кариотип является неблагоприятным фактором прогноза у больных ХЛЛ. Согласно данным литературы, комплексный кариотип сохраняет неблагоприятное прогностическое значение у больных ХЛЛ, получающих как стандартную химиотерапию, так и терапию новыми препаратами таргетного действия, такими как ибрутиниб и венетоклакс [14, 22]. Описано, что комплексные нарушения кариотипа коррелируют с коротким временем до начала терапии и низкой общей выживаемостью [24]. В настоящем исследовании сравнение результатов кариотипирования и FISH-анализа показало наибольшую выявляемость комплексного кариотипа при культивировании с DSP30 + IL2 — 13 (26 %) случаев, что в два раза превышает частоту выявления в культуре с LPS + TPA — у 5 (13 %) и методом FISH — у 2 (4 %) больных. Частота выявления комплексного кариотипа при кариотипировании с DSP30 + IL2 в группе больных, получающих терапию, у которых было резистентное и рецидивирующее течение заболевания, и в группе больных до начала терапии составила 84 и 16 % соответственно.

В литературе описана взаимосвязь комплексных нарушений кариотипа и делеции 17p и 11q [15, 23]. Именно с данной корреляцией многие исследователи связывают неблагоприятное прогностическое значение комплексных нарушений кариотипа [4, 15, 31]. Однако в работах Thompson и соавт. [14] и Rigolin и соавт. [24] показано, что вне зависимости от наличия делеции 17p комплексный кариотип является независимым неблагоприятным фактором прогноза. В проведенном нами исследовании делеция 17p методом FISH была определена

у 5 (38,5 %) из 13 больных с комплексным кариотипом. В 5 из 8 случаев с комплексными нарушениями без делеции 17p в кариотипе присутствовала делеция 11q.

Ряд исследователей выделяет в отдельную группу риска больных ХЛЛ с выявленными при кариотипировании транслокациями [15, 23, 24]. В работе Maug и соавт. [25] впервые было показано, что наличие любых транслокаций имеет неблагоприятное значение при ХЛЛ. Несбалансированные транслокации могут быть выявлены в составе комплексного кариотипа в 35–73 % случаев [15, 24]. В нашем исследовании наиболее часто несбалансированные транслокации в повторяющихся точках разрыва хромосом (2q, 7p, 8p, 17p, 15q, 19q) выявлялись в составе комплексного кариотипа — у 10 из 17 (59 %). В ряде исследований показано, что наличие несбалансированных перестроек в составе комплексного кариотипа связано с укорочением времени до начала терапии и низкой общей выживаемостью [15, 24].

Среди сбалансированных транслокаций у 4 больных выявлены транслокации, затрагивающие локус генов *IGH* (14q32): t(6;14)(p21;q32), t(9;14)(p13;q31-32), t(2;14)(p14-15;q31-32), t(14;19)(q32;q13), что подтверждено методом FISH с использованием зонда к локусу генов *IGH*. По данным литературы, транслокации с вовлечением локуса генов *IgH* встречаются в 5–7 % случаев ХЛЛ и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом [4, 26, 27].

В данной работе показано, что выявляемые при FISH делеции 13q14, 11q22, 17p13 могут в отдельных случаях сопровождаться при СЦИ сбалансированными или несбалансированными транслокациями в этих локусах, что согласуется с данными других авторов [4, 15]. Были выявлены делеция 13q и t(13;18)(q14;p11) в разных субклонах, несбалансированные транслокации с вовлечением локусов 11q22 и 17p13, различные хромосомные аберрации — делеции, сбалансированные или несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 17p13/*TP53*. Возможно, что все случаи объединяет схожее развитие клональной эволюции: возникновение в исходном клоне делеции, затем в ходе опухолевой прогрессии образование субклонов со сбалансированными и несбалансированными транслокациями в известной точке разрыва хромосомы и в целом нарастание геномной нестабильности.

Частичная трисомия хромосомы 12 в виде несбалансированной транслокации t(12;16)(q14;q23) была определена только при культивировании ввиду того, что в набор для проведения FISH-исследования включена проба, которая представляет собой ДНК-зонд к центромерному региону хромосомы 12. Для подтверждения частичной трисомии хромосомы 12 мы использовали ДНК-зонд к локусу гена *MDM2/12q15*. В литературе описано, что трисомия хромосомы 12 может быть представлена как в виде полной, так и в виде частичной трисомии [8, 32].

Определен минимальный участок дупликации — регион q13q22, в котором ведется поиск генов-кандидатов, предположительно среди них *HPIR*, *MYF6*, *ANAPC5*, *E2F1*, *VAX*, *P27*, *CDK4* и ген *MDM-2* [33–35]. Считается, что нет отличия в прогностическом значении полной и частичной трисомии ввиду того, что частичная трисомия происходит за счет дупликации региона q13q22 хромосомы 12 [8].

Результаты СЦИ и FISH различаются по частоте выявленных хромосомных аномалий. В настоящем исследовании наиболее часто встречающейся хромосомной aberrацией по результатам FISH-исследования была делеция 13q14, которая выявлена в 19 (38 %) случаев, из них в 5 — биаллельная делеция. При СЦИ делеция 13q была определена только у 7 (14 %) пациентов в культуре с DSP30 + IL2 и у 2 (4 %) — в культуре с LPS + TPA. Описано, что делеция 13q14 более чем в половине случаев является субмикроскопической и не определяется при СЦИ [13, 36, 37]. Полученные данные согласуются с результатами других исследований: делеция 13q была определена при СЦИ с использованием DSP30 + IL2 менее чем в половине случаев по сравнению с частотой выявления методом FISH (14 и 38 % соответственно). По данным литературы, у больных ХЛЛ до начала терапии делеция 13q14 при FISH-анализе выявляется в 55–57 % [4, 5].

Литература

1. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131: 2745–60. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806398
2. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфолифферативных заболеваний. Под ред. И.В. Поддубной, В.Г. Савченко. М., 2018: 179–200.
3. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48: 198–206. DOI: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1 < 198::AID-CNCR2820480131>3.0.CO;2-V
4. Haferlach C., Dicker F., Schnittger S., et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: A study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVHstatus and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007; 21: 2442–51. DOI: 10.1038/sj.leu.2404935
5. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1910–6. DOI: 10.1056/NEJM200012283432602
6. Van Dyke D.L., Werner L., Rassenti L.Z., et al. The Döhner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016; 173: 105–13. DOI: 10.1111/bjh.13933
7. Gahrton G., Robert K.H., Friberg K., et al. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood*. 1980; 56: 640–7.
8. Juliusson G., Oscier D.G., Fitchett M., et al. Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities. *N Engl J Med*. 1990; 323: 720–4. DOI: 10.1056/NEJM199009133231105

В проведенном исследовании частота выявления делеции 11q в культуре DSP30 + IL2, LPS + TPA и методом FISH составила 13 (26 %), 6 (13 %) и 17 (34 %). Согласно литературным данным, делеция 11q на момент диагностики определяется у 12–19 % больных ХЛЛ методом FISH [4, 5, 9]. Можно предположить, что более низкая выявляемость делеции 13q и более высокая частота делеции 11q связана с включением в исследование больных с прогрессией и рефрактерным течением заболевания, которые характерны для больных с делецией 11q и не свойственны для больных с делецией 13q. По данным FISH, делеция 11q выявлена у 37 % (7 из 19) больных с рецидивирующим и рефрактерным течением, из них у 3 — в составе комплексного кариотипа. На момент диагностики делеция 11q определялась у 23 % (7 из 31) больных ХЛЛ.

Таким образом, при совместном использовании двух методов исследования, СЦИ и FISH, значительно увеличивается частота выявления хромосомных aberrаций. Выполнение СЦИ с использованием при культивировании DSP30 и IL2 не заменяет FISH, но является необходимым методом исследования, позволяющим выявлять дополнительные хромосомные aberrации, в том числе транслокации и, что особенно важно, выделять группу больных самого неблагоприятного прогноза ХЛЛ с комплексными нарушениями для разработки терапевтической тактики.

References

1. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131: 2745–60. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806398
2. Russian clinical guidelines for the diagnosis and treatment of lymphoproliferative diseases. Ed.: Poddubnaya I.V., Savchenko V.G. Moscow; 2018 (In Russian).
3. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48: 198–206. DOI: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1 < 198::AID-CNCR2820480131>3.0.CO;2-V
4. Haferlach C., Dicker F., Schnittger S., et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: A study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVHstatus and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007; 21: 2442–51. DOI: 10.1038/sj.leu.2404935
5. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1910–6. DOI: 10.1056/NEJM200012283432602
6. Van Dyke D.L., Werner L., Rassenti L.Z., et al. The Döhner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016; 173: 105–13. DOI: 10.1111/bjh.13933
7. Gahrton G., Robert K.H., Friberg K., et al. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood*. 1980; 56: 640–7.
8. Juliusson G., Oscier D.G., Fitchett M., et al. Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities. *N Engl J Med*. 1990; 323: 720–4. DOI: 10.1056/NEJM199009133231105
9. Zakharova A.I., Obukhova T.N., Lorie Yu.Yu., et al. Cytogenetic abnormalities

9. Захарова А.И., Обухова Т.Н., Лорие Ю.Ю. и др. Цитогенетические нарушения при хроническом В-клеточном лимфолейкозе и их связь с клинико-биологическими особенностями и прогнозом заболевания. *Терапевтический Архив*. 2006; 78: 57–62.
10. Decker T., Schneller F., Sparwasser T., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000; 95(3): 999–1005.
11. Burger J.A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc. Hematol Educ Progr*. 2011; 96–103. DOI: 10.1182/asheducation-2011.1.96
12. Decker T., Schneller F., Kronschnabl M., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*. 2000; 28: 558–68. DOI: 10.1016/S0301-472X(00)00144-2
13. Dicker F., Schnittger S., Haferlach T., et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80 % of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006. Nov 1;108(9):3152-60. DOI: 10.1182/blood-2006-02-005322
15. Baliakas P., Iskas M., Gardiner A., et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014; 89: 249–55. DOI: 10.1002/ajh.23618
16. Döhner H., Fischer K., Bentz M., et al. p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*. 1995; 85: 1580–9.
17. Gonzalez D., Martinez P., Wade R., et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2223–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.0838
18. Zenz T., Habe S., Denzel T., et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*. 2009; 114: 2589–97. DOI: 10.1182/blood-2009-05-224071
19. Stilgenbauer S., Eichhorst B., Schetelig J., et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. *J Clin Oncol*. 2018; 36: 1973–80. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.6840
20. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 369: 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637
21. O'Brien S., Jones J.A., Coutre S.E., et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016; 17: 1409–18. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30212-1
22. Anderson M.A., Tam C., Lew T.E., et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017; 129: 3362–70. DOI: 10.1182/blood-2017-01-763003
23. Dicker F., Herholz H., Schnittger S., et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009; 23: 117–24. DOI: 10.1038/leu.2008.274
24. Rigolin G.M., Saccetti E., Guardalben E., et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br J Haematol*. 2018; 181: 229–33. DOI: 10.1111/bjh.15174
- in chronic B-cell lymphocytic leukemia and their connection with clinical and biological features and prognosis of the disease. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2006; 78: 57–62 (In Russian).
10. Decker T., Schneller F., Sparwasser T., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000; 95(3): 999–1005.
11. Burger J.A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc. Hematol Educ Progr*. 2011; 96–103. DOI: 10.1182/asheducation-2011.1.96
12. Decker T., Schneller F., Kronschnabl M., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*. 2000; 28: 558–68. DOI: 10.1016/S0301-472X(00)00144-2
13. Dicker F., Schnittger S., Haferlach T., et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80 % of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006. Nov 1;108(9):3152-60. DOI: 10.1182/blood-2006-02-005322
15. Baliakas P., Iskas M., Gardiner A., et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014; 89: 249–55. DOI: 10.1002/ajh.23618
16. Döhner H., Fischer K., Bentz M., et al. p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*. 1995; 85: 1580–9.
17. Gonzalez D., Martinez P., Wade R., et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2223–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.0838
18. Zenz T., Habe S., Denzel T., et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*. 2009; 114: 2589–97. DOI: 10.1182/blood-2009-05-224071
19. Stilgenbauer S., Eichhorst B., Schetelig J., et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. *J Clin Oncol*. 2018; 36: 1973–80. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.6840
20. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 369: 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637
21. O'Brien S., Jones J.A., Coutre S.E., et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016; 17: 1409–18. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30212-1
22. Anderson M.A., Tam C., Lew T.E., et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017; 129: 3362–70. DOI: 10.1182/blood-2017-01-763003
23. Dicker F., Herholz H., Schnittger S., et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009; 23: 117–24. DOI: 10.1038/leu.2008.274
24. Rigolin G.M., Saccetti E., Guardalben E., et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br J Haematol*. 2018; 181: 229–33. DOI: 10.1111/bjh.15174

25. Mayr C., Speicher M.R., Kofler D.M., et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 742–51. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2093
26. Cavazzini F., Hernandez J.A., Gozzetti A., et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07227.x
27. Satterwhite E., Sonoki T., Willis T.G., et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood*. 2001; 98: 3413–20.
28. Iida S., Rao P.H., Ueda R., et al. Chromosomal Rearrangement of the PAX-5 Locus in Lymphoplasmacytic Lymphoma with t(9; 14) (p13; q32). *Leuk Lymphoma*. 1999; 34: 25–33. DOI: 10.3109/10428199909083377
29. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* (London, England). 1971; 2: 971–2.
30. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. (eds). Basel: Karger; 2016.
31. Jaglowski S.M., Ruppert A.S., Heerema N.A., et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012; 159: 82–7. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09239.x
32. Bird M.L., Ueshima Y., Rowley J.D. Chromosome abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia and their clinical correlations. *Leukemia*. 1989; 3: 182–91.
33. Haslinger C., Schweifer N., Stilgenbauer S., et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 3937–49. DOI: 10.1200/JCO.2004.12.133
34. Porpaczy E., Bilban M., Heinze G., et al. Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39: 568–75. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02146.x
35. Kienle D.L., Korz C., Hosch B., et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3780–92. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.568
36. Karakosta M., Manola K.N. The parallel application of karyotype interphase and metaphase FISH after DSP-30/IL-2 stimulation is necessary for the investigation of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 2016; 21: 526–35. DOI: 10.1080/10245332.2015.1110948
37. Shi M., Cipollini M.J., Crowley-Bish P.A., et al. Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation. *Am J Clin Pathol*. 2013; 139: 662–9. DOI: 10.1309/AJCP7G4VMYZJQVFI
25. Mayr C., Speicher M.R., Kofler D.M., et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 742–51. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2093
26. Cavazzini F., Hernandez J.A., Gozzetti A., et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07227.x
27. Satterwhite E., Sonoki T., Willis T.G., et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood*. 2001; 98: 3413–20.
28. Iida S., Rao P.H., Ueda R., et al. Chromosomal Rearrangement of the PAX-5 Locus in Lymphoplasmacytic Lymphoma with t(9; 14) (p13; q32). *Leuk Lymphoma*. 1999; 34: 25–33. DOI: 10.3109/10428199909083377
29. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* (London, England). 1971; 2: 971–2.
30. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. (eds). Basel: Karger; 2016.
31. Jaglowski S.M., Ruppert A.S., Heerema N.A., et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012; 159: 82–7. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09239.x
32. Bird M.L., Ueshima Y., Rowley J.D. Chromosome abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia and their clinical correlations. *Leukemia*. 1989; 3: 182–91.
33. Haslinger C., Schweifer N., Stilgenbauer S., et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 3937–49. DOI: 10.1200/JCO.2004.12.133
34. Porpaczy E., Bilban M., Heinze G., et al. Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39: 568–75. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02146.x
35. Kienle D.L., Korz C., Hosch B., et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3780–92. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.568
36. Karakosta M., Manola K.N. The parallel application of karyotype interphase and metaphase FISH after DSP-30/IL-2 stimulation is necessary for the investigation of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 2016; 21: 526–35. DOI: 10.1080/10245332.2015.1110948
37. Shi M., Cipollini M.J., Crowley-Bish P.A., et al. Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation. *Am J Clin Pathol*. 2013; 139: 662–9. DOI: 10.1309/AJCP7G4VMYZJQVFI

Информация об авторах

Кислицына Мария Анатольевна*, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории кариологии, аспирант лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: makislitsyna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3337-2487>

Обухова Татьяна Никифоровна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: obukhova_t@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

Information about the authors

Maria A. Kislitsyna*, Medical Laboratory Specialist, Postgraduate researcher, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology, e-mail: makislitsyna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3337-2487>

Tatyana N. Obukhova, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory Karyology, National Research Centre of Hematology, e-mail: obukhova_t@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

Алимова Галина Анатольевна, врач — лабораторный генетик лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: galialy@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5431-2240>

Шишигина Любовь Александровна, специалист по молекулярной биологии лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: lubov_shishigina@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7157-6643>

Гребенюк Любовь Алексеевна, специалист по молекулярной биологии лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: lyuba.grebenyuk@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2117-8775>

Абрамова Татьяна Валерьевна, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: abramova.blood@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3163-4930>

Горячева Светлана Рудольфовна, кандидат медицинских наук, врач-гематолог консультативного гематологического отделения с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: goryacheva.s@blood.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3906-9171>

Моисеева Татьяна Николаевна, кандидат медицинских наук, заведующая консультативным гематологическим отделением с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: taniamoiseeva@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9591-8508>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила 10.01.19

Принята к печати 14.05.2019

Galina A. Alimova, Medical Laboratory Specialist, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology,
e-mail: galialy@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5431-2240>

Lyubov A. Shishigina, Molecular Biology Specialist, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology,
e-mail: lubov_shishigina@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7157-6643>

Lyubov A. Grebenyuk, Molecular Biology Specialist, Karyology Laboratory, National Research Centre of Hematology,
e-mail: lyuba.grebenyuk@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2117-8775>

Tatyana V. Abramova, Cand. Sci. (Med.), Medical Laboratory Specialist, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology,
e-mail: abramova.blood@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3163-4930>

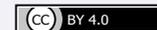
Svetlana R. Goryacheva, Cand. Sci. (Med.), Physician-Hematologist, Hematology Department with an Outpatient Facility for Intensive High-dose Chemotherapy, National Research Centre of Hematology,
e-mail: goryacheva.s@blood.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3906-9171>

Tatyana N. Moiseeva, Cand. Sci. (Med.), Head of the Hematology Department with an Outpatient Facility for Intensive High-dose Chemotherapy, National Research Centre of Hematology,
e-mail: taniamoiseeva@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9591-8508>

*** Corresponding author**

Received 10 Jan 2019

Accepted 14 May 2019

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-35-48>

ПОВТОРНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Кузьмина Л. А.*, Конова З. В., Паровичникова Е. Н., Дроков М. Ю., Васильева В. А., Попова Н. Н., Савченко В. Г.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Основными причинами неудач трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) являются рецидивы злокачественных заболеваний системы крови и несостоятельность трансплантата. В этих случаях как один из вариантов лечения может рассматриваться проведение повторной алло-ТГСК.

Целью исследования стала оценка эффективности, общей и бессобытийной выживаемости в зависимости от причины и сроков проведения повторной алло-ТГСК, а также определение влияния смены донора на результаты повторной алло-ТГСК.

Больные и методы. В исследование включено 24 больных (12 мужчин, 12 женщин) острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) ($n = 14$), острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ) ($n = 4$), миелопролиферативными заболеваниями (МПЗ) ($n = 3$) и миелодиспластическим синдромом (МДС) ($n = 3$), которым была проведена повторная алло-ТГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Возраст больных был от 18 до 56 лет (медиана возраста — 32 года). У 11 больных была выполнена вторая алло-ТГСК по поводу рецидива гемобластоза, у 13 — вследствие недостаточности трансплантата. У половины больных ($n = 12$) повторная алло-ТГСК выполнена менее чем через 6 месяцев после первой алло-ТГСК.

Результаты. После второй алло-ТГСК восстановление донорского кроветворения отмечено у 18 из 24 (75 %) больных, у 3 больных констатирована несостоятельность трансплантата, у 3 — ранний рецидив острого лейкоза. После приживления трансплантата 9 из 18 (50 %) больных умерли в первые 100 дней после алло-ТГСК вследствие инфекционных осложнений и/или токсичности, находясь в ремиссии гемобластоза, еще 3 больных умерли в более поздние сроки от прогрессии гемобластоза. Общая летальность составила 61,5 %. Медиана продолжительности жизни и бессобытийного течения у больных после повторной алло-ТГСК составила 13,05 и 10,59 мес. соответственно. Трехлетняя общая выживаемость (ОВ) и бессобытийная выживаемость (БСВ) составили 38,5 и 27,6 % соответственно. Выявлены значимые различия в ОВ у больных с более длительным (>6 мес.) интервалом между проведением первой и второй алло-ТГСК. Смена донора не оказала значимого влияния на ОВ и БСВ.

Ключевые слова: острый лейкоз, повторная трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Кузьмина Л.А., Конова З.В., Паровичникова Е.Н., Дроков М.Ю., Васильева В.А., Попова Н.Н., Савченко В.Г. Повторная трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных гемобластозами. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 35–48. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-35-48>

SECOND ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Kuzmina L. A., Konova Z. V., Parovichnikova E. N., Drovkov M. Y., Vasilyeva V. A., Popova N. N., Savchenko V. G.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a standard treatment for many patients with hematological malignancies. Complications of allo-HSCT are frequently associated either with a relapse of the underlying disease or a graft failure. Second transplantation can be offered to selected patients and is seen as the only curative option. In this paper, we report the experience of managing 24 such patients, all of whom underwent a second allo-HSCT.

Patients and methods. The research involved 24 patients (12 males/12 females) suffering from acute myeloid leukemia (AML, $n = 14$), acute lymphoblastic leukemia (ALL, $n = 4$), myeloproliferative disease (MPD, $n = 3$) and myelodysplastic syndrome (MDS, $n = 3$). The patients' age ranged from 18 to 56 years, with the median age being 32 years. All the patients underwent a second allo-HSCT due to the disease relapse ($n = 11$) or graft failure ($n = 13$). 12 patients underwent a second allo-HSCT within the period of less than 6 months after the first allo-HSCT.

Results. Following the second allo-HSCT, engraftment occurred in 18/24 (75 %) patients, while 3 patients demonstrated graft failure and 3 — disease progression. Out of 18 patients having engrafted, 9 (50%) died during the first 100 days after allo-HSCT as a result of severe infections or visceral toxicity. 3 more lethal outcomes were recorded in later periods due to the disease progression. The overall mortality rate after the second allo-HSCT equalled 61.5 %. The median overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) rates were 13.5 months and 10.59 months, respectively. Three-year OS and DFS were 38.5 % and 27.6 % respectively. Significant differences in terms of OS were detected for patients with a longer interval (>6 months) between the first and second allo-HSCT. The change of a donor was not associated with a better clinical outcome.

Keywords: second allo-HSCT; acute leukemia; hematological malignancies

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Kuzmina L.A., Konova Z.V., Parovichnikova E.N., Drovkov M.Y., Vasilyeva V.A., Popova N.N., Savchenko V.G. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 35–48 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-35-48>

Введение

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови (алло-ТГСК) как метод, позволяющий не только достичь длительной полной ремиссии злокачественных заболеваний системы крови, но и в некоторых случаях добиться биологического излечения, уже давно стала стандартом терапии большинства гемобластозов [1]. Однако алло-ТГСК не всегда оказывается эффективной. Основными причинами неудач этого метода лечения являются рецидивы заболева-

ния и несостоятельность (неприживление/отторжение) трансплантата. По данным разных авторов, частота развития рецидивов варьирует в зависимости от варианта гемобластоза, цитогенетических факторов риска, статуса заболевания перед ТГСК и может достигать 50 % [2–4]. Прогноз у таких больных крайне неблагоприятен, особенно при развитии рецидива в первые полгода после алло-ТГСК. При этом возможности терапии могут быть резко ограничены, что обусловлено вероятной

резистентностью опухолевых клеток к химиотерапии, а также тяжелым соматическим статусом больного, связанным с накопленной токсичностью, инфекционными осложнениями и/или реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [2, 5]. В настоящее время для лечения посттрансплантационных рецидивов заболевания наиболее часто используют адоптивную иммунотерапию трансфузиями донорских лимфоцитов (ТДЛ) с предшествующей химиотерапией или без нее [6–10] и повторную алло-ТГСК [11–14]. К сожалению, эффективность этих методов остается невысокой. По данным зарубежных ретроспективных исследований последних лет, двухлетняя общая выживаемость больных, у которых в качестве терапии рецидивов заболевания после алло-ТГСК были использованы ТДЛ, составила от 16 до 29 % [8, 15–17]. В многоцентровом исследовании EBMT, включавшем 2632 больных, при выполнении повторной алло-ТГСК общая выживаемость (ОВ) больных в течение одного года составила 40 %, в течение 5 лет — 20 %, безрецидивная выживаемость (БРВ) — 33 и 40 % соответственно [18].

Неприживление и отторжение трансплантата также ассоциированы с крайне неблагоприятным прогнозом, хотя встречаются реже, чем рецидивы заболевания. В среднем их частота составляет 5 %: при трансплантации от HLA-идентичных сиблингов — 1 %, при неродственной полностью совместимой трансплантации от 1 до 5 %, и 5–10 %, если донор был частично совместим [19–22]. Вероятность развития несостоятельности трансплантата зависит от многих факторов: основного диагноза и статуса заболевания на момент трансплантации, режима кондиционирования, наличия у реципиента анти-HLA антител, источника трансплантата и его клеточности, совместимости в паре донор-реципиент, особенностей стромального микроокружения реципиента гемопоэтических стволовых клеток, а также инфекционного статуса больного перед алло-ТГСК [23].

Существуют несколько подходов к ведению больных с неприживлением трансплантата. При наличии заранее заготовленных стволовых клеток или костного мозга больного возможно выполнение аутологичной ТГСК. Широко применяются дополнительные инфузии гемопоэтических стволовых клеток без предшествующего кондиционирования [24, 25], стимуляция гемопоэза посредством гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) или гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [26–28], но эти подходы наиболее эффективны в отношении дисфункции трансплантата на фоне 100 % «донорской химеры» в костном мозге больного [24–28]. В рамках терапии первичного неприживления или отторжения трансплантата большинство авторов рекомендуют рассматривать повторную алло-ТГСК от того же или другого донора [29, 30]. Однако данные литературы, в которых представ-

лены результаты этого подхода, весьма противоречивы, ОВ больных варьирует от 11 до 70 % [31–37].

Таким образом, посттрансплантационные рецидивы и прогрессия заболевания, а также несостоятельность трансплантата после алло-ТГСК являются жизнеугрожающими осложнениями и показаниями к проведению повторной алло-ТГСК. К сожалению, учитывая, как правило, тяжелый соматический статус больных, такая терапия может быть ассоциирована с высокой летальностью, связанной с лечением [38]. В последнее время, во многом благодаря совершенствованию режимов предтрансплантационного кондиционирования, иммуносупрессивной, сопроводительной и антибактериальной терапии, все большее количество исследователей склоняется к тому, что этот метод является потенциально наиболее эффективным в решении проблемы неудач после первой алло-ТГСК [39, 40].

Целью настоящего исследования стала оценка эффективности, ОВ и БРВ в зависимости от причины выполнения и сроков проведения повторной алло-ТГСК, а также определение влияния смены донора на результаты повторной алло-ТГСК.

Больные и методы

В исследование было включено 24 больных (12 мужчин и 12 женщин) злокачественными заболеваниями системы крови: острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) ($n = 14$), острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ) ($n = 4$), миелопролиферативными заболеваниями (МПЗ) ($n = 3$) и миелодиспластическим синдромом (МДС) ($n = 3$), которым была проведена повторная алло-ТГСК в ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России с ноября 2012 по июнь 2017 г. Медиана возраста больных на момент повторной алло-ТГСК составила 32 (18–56) года. В таблице 1 представлена общая характеристика больных в зависимости от причин выполнения повторной алло-ТГСК.

Первая ТГСК была выполнена от родственных HLA-идентичных доноров у 3 больных, у 11 больных — от неродственных полностью совместимых доноров, у 5 — от неродственных частично совместимых (1–2 различия), в двух случаях доноры были гаплоидентичны. В качестве источника трансплантата для первой алло-ТГСК в большинстве случаев ($n = 19$) использовался костный мозг, медиана клеточности составляла 3×10^8 миелокариоцитов (от 2×10^8 до $5,3 \times 10^8$ миелокариоцитов), для 4 больных источником трансплантата послужили периферические стволовые клетки (5×10^6 CD34⁺ клеток), для одного больного были использованы стволовые клетки из пуповинной крови — $4,7 \times 10^7$ ядродержащих клеток.

Для статистического анализа больные были разделены на группы в зависимости от причины выполнения повторной трансплантации (несостоятельность трансплантата и рецидив гемобластоза после первой алло-ТГСК), от временного интервала между первой

Таблица 1. Характеристика больных, которым была выполнена повторная алло-ТГСК

Table 1. Characteristics of patients with second allo-HSCT

Параметры <i>Parameters</i>	Всего, % <i>Total, %</i>	Показание к выполнению повторной алло-ТГСК <i>Indications for second allo-HSCT</i>	
		рецидив заболевания (n = 11) <i>disease relapse (n = 11)</i>	несостоятельность трансплантата (n = 13) <i>graft failure (n = 13)</i>
Пол: <i>Sex:</i>			
• мужской • <i>male</i>	12 (50 %)	5	6
• женский • <i>female</i>	12 (50 %)	6	7
Медиана возраста <i>Age, median (min-max)</i>	32 (18–56)	32 (25–56)	35 (18–53)
Диагнозы: <i>Hematological malignancies:</i>			
• острый миелоидный лейкоз • <i>acute myeloid leukaemia</i>	14 (58,3 %)	8	5
• острый лимфобластный лейкоз • <i>acute lymphoblastic leukemia</i>	4 (16,7 %)	2	2
• миелопролиферативные заболевания • <i>myeloproliferative disease</i>	3 (12,5 %)	0	3
• МДС • <i>myelodysplastic syndrome</i>	3 (12,5 %)	1	2
Донор: <i>Donor:</i>			
• тот же • <i>the same</i>	14 (58,3 %)	4	10
• другой • <i>another</i>	10 (41,7 %)	7	3
Источник трансплантата: <i>Stem cell source:</i>			
• костный мозг • <i>bone marrow</i>	4 (16,7 %)	4	0
• периферические стволовые клетки крови • <i>peripheral hematopoietic stem cells</i>	20 (83,3 %)	7	13
Тип донора: <i>Donor type:</i>			
• родственный • <i>related</i>	5 (20,8 %)	2	3
• неродственный • <i>unrelated</i>	19 (79,2 %)	9	10
Совместимость донора: <i>Donor Matching:</i>			
• HLA-идентичный • <i>HLA-identical donor</i>	17 (70,8 %)	8	8
• частично совместимый • <i>mismatched unrelated donor</i>	6 (25 %)	3	4
• гаплоидентичный • <i>haploidentical donor</i>	1 (4,2 %)	–	1
Режимы кондиционирования: <i>Conditioning regimens:</i>			
• HAM-RIC • <i>HAM-RIC</i>	4 (16,7 %)	4	0
• FluMe • <i>FluMe</i>	12 (50 %)	2	10
• TreoCy • <i>TreoCy</i>	2 (8,3 %)	0	2
• другие • <i>others</i>	6 (25 %)	5	1

и второй алло-ТГСК (менее и более 6 месяцев), а также в зависимости от того, выполнялась повторная алло-ТГСК от того же донора или от другого.

Временной интервал между первой и второй алло-ТГСК составил менее 6 мес. у половины больных. В 11 случаях показанием для проведения второй алло-ТГСК были рецидивы заболевания, в 13 случаях — неприживление/отторжение трансплантата. Неприживлением трансплантата считали отсутствие восстановления количества лейкоцитов периферической крови (лейкоциты более $1,0 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилы более $0,5 \times 10^9/\text{л}$) на +28 день алло-ТГСК и на +42 день трансплантации клеток пуповинной крови), в случае уменьшения количества нейтрофилов в периферической крови менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$ (в течение 3 дней) после первичного приживления с доказанным донорским химеризмом констатировали отторжение трансплантата.

У 4 больных повторная алло-ТГСК была выполнена от родственного совместимого донора, у 13 — от неродственного совместимого донора, у 6 больных — от неродственного частично совместимого донора. Одному больному была выполнена алло-ТГСК от гаплоидентичного донора — отца, показанием к выполнению второй трансплантации у данного больного послужило неприживление трансплантата после алло-ТГСК от другого гаплоидентичного донора — матери.

У 14 больных была проведена вторая алло-ТГСК от того же донора, у 10 — от другого. При рецидиве заболевания смена донора выполнена у 7 из 11 больных, при несостоятельности — у 3 из 13 больных.

В качестве источника трансплантата при повторной алло-ТГСК у 20 больных использовались периферические стволовые клетки крови от 3×10^6 и до 7×10^6 CD34⁺ клеток на килограмм массы тела с медианой клеточности $5 \times 10^6/\text{кг}$, у 4 — костный мозг, медиана клеточности составляла $2,8 \times 10^8/\text{кг}$ миелокариоцитов (от $1,52 \times 10^8$ до $5,2 \times 10^8/\text{кг}$).

Подавляющему большинству больных перед повторной алло-ТГСК было проведено кондиционирование в режиме пониженной интенсивности ($n = 22$). У 13 из 22 больных было выполнено кондиционирование с использованием мелфалана: 11 больным по программе флударабин + мелфалан (флударабин $150 \text{ мг}/\text{м}^2$, мелфалан $140 \text{ мг}/\text{м}^2$), одному — клофарабин + мелфалан (клофарабин $150 \text{ мг}/\text{м}^2$, мелфалан $140 \text{ мг}/\text{м}^2$), для одного из больных был выбран режим мелфалан — $140 \text{ мг}/\text{м}^2$, у 3 больных использовали треосульфан-содержащие режимы: 2 больным проводили кондиционирование по программе треосульфан + циклофосфан (треосульфат $30 \text{ г}/\text{м}^2$, циклофосфан $120 \text{ мг}/\text{кг}$), одному — треосульфан + флударабин (треосульфат $30 \text{ г}/\text{м}^2$, флударабин $150 \text{ мг}/\text{м}^2$). Двум больным было выполнено кондиционирование в миелоаблативном режиме: кондиционирование по схеме мелфалан $200 \text{ мг}/\text{м}^2$ было проведено одной больной, которой повторная алло-ТГСК выполнена в связи с развитием несостоятельности

трансплантата, одной больной с рецидивом заболевания перед второй алло-ТГСК было выполнено кондиционирование по программе флударабин + мелфалан (флударабин $150 \text{ мг}/\text{м}^2$, мелфалан $200 \text{ мг}/\text{м}^2$). У 5 больных повторная алло-ТГСК была выполнена на фоне развернутой фазы злокачественного заболевания системы крови; с целью преодоления рефрактерности опухолевых клеток к воздействию цитостатических препаратов были использованы модифицированные режимы кондиционирования: у 4 больных было проведено кондиционирование по программе НАМ-РИС (цитарабин $18 \text{ г}/\text{м}^2$, митоксантрон $20 \text{ мг}/\text{м}^2$, флударабин $150 \text{ мг}/\text{м}^2$, бусульфат $8 \text{ мг}/\text{кг}$), одному больному — FLAMSA-РИС (цитарабин $6 \text{ г}/\text{м}^2$, идарубицин $20 \text{ мг}/\text{м}^2$, флударабин $150 \text{ мг}/\text{м}^2$, бусульфат $8 \text{ мг}/\text{кг}$, гемтузумаб озогамидин $6 \text{ мг}/\text{м}^2$).

Схемы иммуносупрессивной терапии (ИСТ) варьировали в зависимости от HLA-совместимости донора и реципиента, а также статуса гемобластоза перед второй алло-ТГСК. Для 9 больных был выбран режим циклоспорин А (ЦСА) в дозе $3 \text{ мг}/\text{кг}/\text{сут}$ с -1 дня алло-ТГСК, метотрексат в дозе $15 \text{ мг}/\text{м}^2$ в +1 день, $10 \text{ мг}/\text{м}^2$ в +3, +6, +11 дни, микофенолата мофетил (ММФ) $2-3 \text{ г}/\text{сут}$ с +1 дня после алло-ТГСК. Пяти больным с целью индукции толерантности на +3 и +4 дни вводился циклофосфамид (ЦФ) в дозе $50 \text{ мг}/\text{кг}/\text{сут}$, далее проводилась терапия ММФ $2-3 \text{ г}/\text{сут}$ с +5 дня после алло-ТГСК, двум больным профилактику РТПХ проводили по схеме ЦФ на +3, +4 дни, далее ЦСА с +5 дня, одна больная получала в качестве ИСТ только ММФ $3 \text{ г}/\text{сут}$ с +1 дня после алло-ТГСК, двум больным проводилась ИСТ по схеме ЦФ + ЦСА + ММФ. Пяти больным, которым повторная алло-ТГСК выполнена на фоне развернутой фазы гемобластоза, проводилась только монотерапия циклофосфамидом. Антитимоцитарный иммуноглобулин лошадиный (АТГам) в дозе $40 \text{ мг}/\text{кг}$ был включен в режим профилактики РТПХ у 8 больных, антитимоцитарный иммуноглобулин кроличий (тимоглобулин) в дозе $7,5 \text{ мг}/\text{кг}$ был использован у 2 больных.

По данным литературы [23], одной из причин несостоятельности трансплантата является повреждение стромального микроокружения, обусловленного как воздействием химиотерапевтических препаратов, так и непосредственно лейкозными клетками. С целью восстановления кроветворного микроокружения 7 больным с несостоятельностью трансплантата в день повторной алло-ТГСК от того же донора, после получения информированного согласия, внутрикостно в губчатую ткань задних верхних остей подвздошных костей вводились мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК). ММСК индивидуально наращивались для больного от собственного донора костного мозга в ФГБУ «НМИЦ гематологии». Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом.

Статистический анализ. ОВ и БСВ рассчитывали по методу Каплана — Майера. При расчете БСВ за событие принимали рецидив, отторжение и смерть больного, при расчете ОВ — смерть больного от любых причин. Больные, живущие в состоянии ремиссии на момент анализа данных, цензурированы 16.10.2017. Сравнение показателей выживаемости в группах выполняли при помощи log-rank теста. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

ОВ больных после повторной алло-ТГСК составила 38,5 %, БСВ — 27,6 %, медиана продолжительности жизни и бессобытийного течения — 13,05 и 10,59 месяца соответственно (рис. 1).

Медиана восстановления числа лейкоцитов периферической крови составила 23 дня (в интервале от 13 до 34), медиана восстановления количества тромбоцитов крови (тромбоциты более $20 \times 10^9/\text{л}$) — 27 дней (от 15 до 50 дней). У 3 больных после повторной алло-ТГСК была констатирована несостоятельность трансплантата, еще у 3 больных — рецидив заболевания.

ОВ больных, которым была выполнена повторная алло-ТГСК в связи с несостоятельностью трансплантата, оказалась выше, чем ОВ при алло-ТГСК, выполненной в связи с рецидивом (45,7 против 34 %), хоть различия и не достигли статистически значимых величин ($p = 0,2$). Медиана ОВ у больных с несостоятельностью трансплантата составила 20,6 мес., у больных с рецидивами заболевания — лишь 4,8 мес. Семи больным с несостоятельностью трансплантата в день повторной алло-ТГСК были введены ММСК, у 5 больных отмечалось восстановление донорского кроветворения, однако у 2 больных в последующем было выявлено отторжение трансплантата из-за тяжелых инфекционных осложнений (рецидивирующей ЦМВ-инфекции), у 2 больных было констатировано неприживление трансплантата после второй алло-ТГСК.

Кумулятивная вероятность БСВ также оказалась выше у больных с несостоятельностью трансплантата (33 %), медиана БСВ — 16,8 мес. против 3,7 мес. для больных с рецидивами заболевания (рис. 2).

Кондиционирование в миелоаблативном режиме было проведено лишь 2 больным: одной больной была

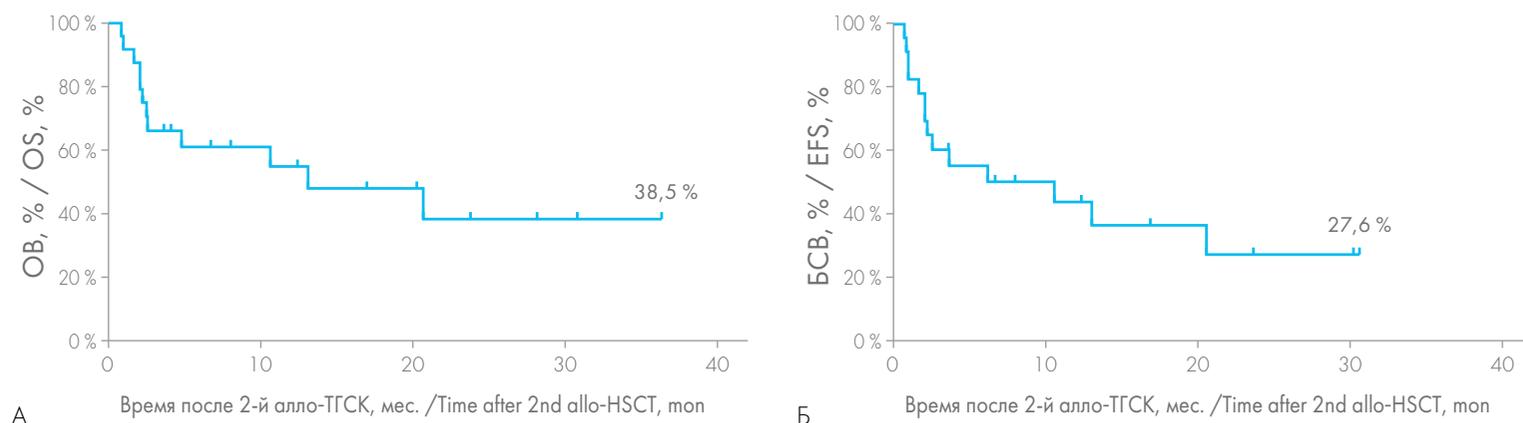


Рисунок 1. Общая выживаемость (ОВ) (А) и бессобытийная выживаемость (БСВ) больных (Б), которым была выполнена повторная алло-ТГСК
Figure 1. Overall survival (OS) (A) and event-free survival (EFS) (B), rates in patients after second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT)

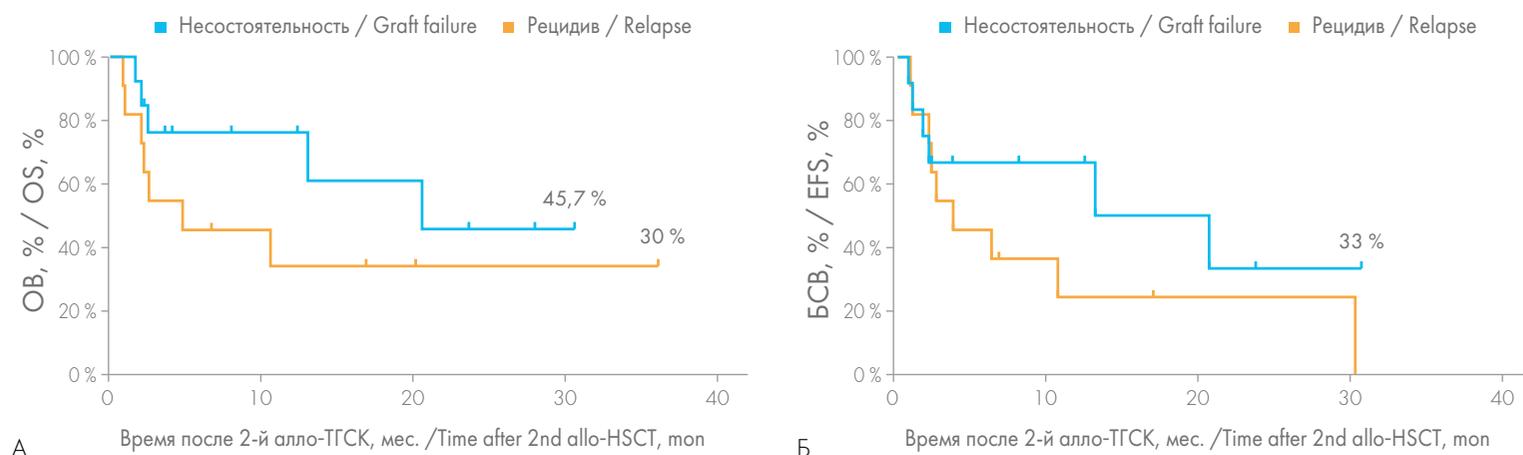


Рисунок 2. Сравнение общей выживаемости (ОВ) (А) и бессобытийной выживаемости (БСВ) (Б) больных, которым была выполнена повторная алло-ТГСК в связи с несостоятельностью трансплантата и по причине рецидива заболевания после первой алло-ТГСК

Figure 2. Comparison of the overall survival (OS) (A) and event-free survival (EFS) (B) rates in patients after second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) due to either graft failure or disease relapse after the first allo-HSCT

выполнена повторная алло-ТГСК в связи с отторжением трансплантата, однако приживление трансплантата не было достигнуто, что потребовало выполнения трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. В дальнейшем у этой больной было отмечено восстановление собственного («хозяйского») кроветворения, в течение 2,5 года у нее сохраняется ремиссия ОМЛ. Другой больной алло-ТГСК с кондиционированием в миелоаблативном режиме была проведена учитывая рефрактерный рецидив ОЛЛ, восстановление числа лейкоцитов периферической крови было зафиксировано на +31 день, однако на +2,5 месяца больная умерла от инфекционных осложнений.

Учитывая накопленную токсичность, часто тяжелый соматический статус, наличие инфекционных осложнений на момент второй алло-ТГСК, 22 из 24 больных было проведено кондиционирование в режиме пониженной интенсивности/токсичности, 11 больным (10 больных с несостоятельностью трансплантата и 1 больная с рецидивом гемобластоза) кондиционирование проводилось по программе флударабин + мелфалан. Приживление трансплантата было отмечено у 9 больных. Вероятность ОВ у этой группы больных составила 47 %, медиана ОВ — 20,59 мес.

У 5 больных с рецидивом заболевания на момент начала кондиционирования с целью преодоления рефрактерности опухолевых клеток к воздействию цитостатических препаратов были использованы модифицированные режимы кондиционирования. У одного больного была использована программа FLAMSA-RIC, впоследствии у него был отмечен повторный рецидив через 30 мес. после второй алло-ТГСК. Четырем больным было проведено кондиционирование по программе HAM-RIC. Медиана ОВ и БСВ в этой группе составили 2,5 и 2,3 мес. соответственно. Один больной умер в связи с инфекционными осложнениями на сроке +10 месяцев, еще один больной умер через месяц после второй алло-ТГСК от острой сердечной недостаточности. Один больной умер от рефрактерного тече-

ния ОМЛ через 4 недели после повторной алло-ТГСК (в миелограмме на +26 день выявлялось 16 % бластных клеток), у одной больной был констатирован рецидив ОМЛ через 6 месяцев после алло-ТГСК.

На момент начала кондиционирования перед повторной алло-ТГСК 18 из 24 больных имели тяжелый соматический статус и инфекционные осложнения. В большинстве случаев повторная алло-ТГСК в короткие сроки (менее 6 мес.) выполнялась по жизненным показаниям в связи с первичным неприживлением трансплантата, на фоне агранулоцитоза и панцитопении, при развитии жизнеугрожающих инфекционных осложнений.

При проведении статистического анализа были выявлены значимые различия в ОВ у больных с более длительным (более 6 мес.) интервалом между проведением первой и второй алло-ТГСК (рис. 3). Ретроспективно медиана ОВ у больных, которым была выполнена вторая алло-ТГСК более чем через 6 мес. после первой алло-ТГСК, составила 20,6 мес., тогда как при меньшем временном интервале — лишь 2,5 мес. ($p = 0,0452$). Однако БСВ не зависела от увеличения интервала между первой и второй алло-ТГСК: медиана БСВ в группе «>6 мес.» составила 10,6 мес., в группе «<6 мес.» — 2,2 мес., данные различия не достигли статистической значимости ($p = 0,1760$).

Большое значение имела оценка целесообразности смены донора аллогенных гемопоэтических стволовых клеток при выполнении повторной алло-ТГСК. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий ($p = 0,0926$), ОВ при выполнении повторной алло-ТГСК от того же донора была несколько выше, чем в случае выбора другого донора (50,8 против 21,9 %) (рис. 4). Практически для всех больных, которым была выполнена повторная алло-ТГСК от того же донора, причиной выполнения повторной алло-ТГСК послужило первичное неприживление трансплантата, что обуславливало необходимость получения трансплантата в кратчайшие сроки, невозможность

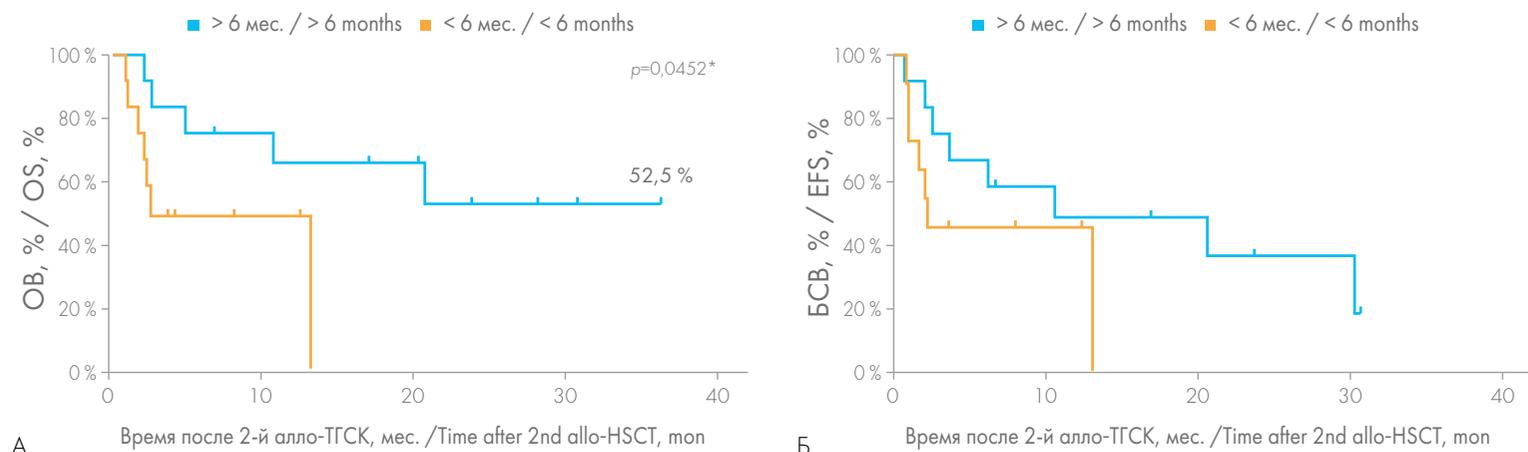


Рисунок 3. Общая выживаемость (ОВ) (А) и бессобытийная выживаемость (БСВ) (Б) больных в зависимости от временного интервала между первой и второй алло-ТГСК
Figure 3. Overall survival (OS) (A) and event-free survival (EFS) (B) rates depending on the time interval between the first and second allo-HSCT

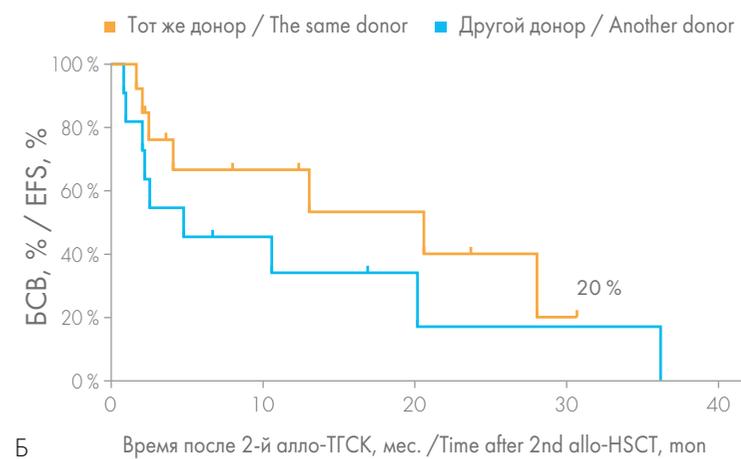
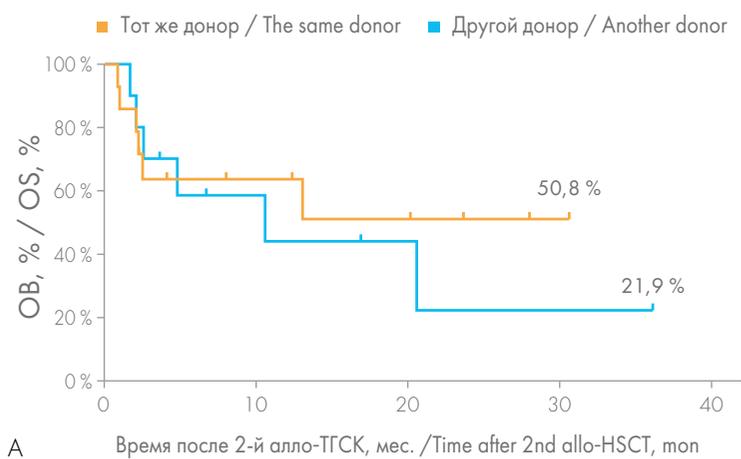


Рисунок 4. Сравнение общей выживаемости (ОВ) (А) и бессобытийной выживаемости (БСВ) (Б) больных при выполнении повторной алло-ТГСК от того же или другого донора
Figure 4. Comparison of the overall survival (OS) (A) and event-free survival (EFS) (B) rates depending on whether a second allo-HSCT was performed from the same or another donor

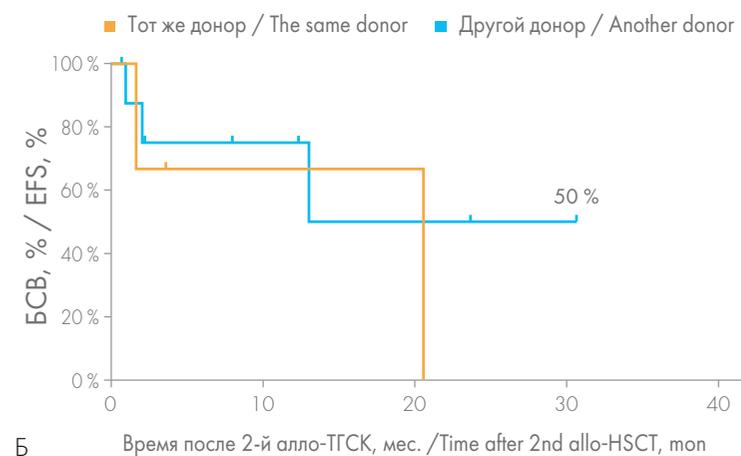
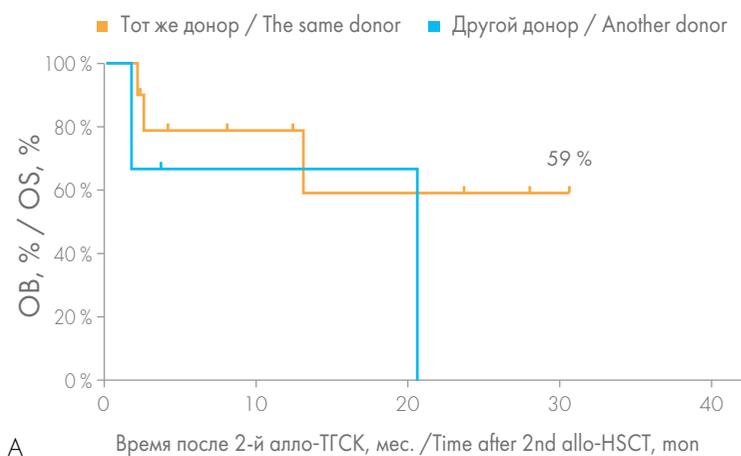


Рисунок 5. Сравнение общей выживаемости (ОВ) (А) и бессобытийной выживаемости (БСВ) (Б) больных при выполнении повторной алло-ТГСК от того же или другого донора у пациентов, которым была выполнена повторная алло-ТГСК по причине несостоятельности трансплантата после первой алло-ТГСК
Figure 5. Comparison of the overall survival (OS) (A) and event-free survival (EFS) (B) rates for patients after second allo-HSCT from the same or another donor due to graft failure after the first allo-HSCT

проведения длительного поиска другого донора. В этой группе больных вероятность ОВ достигла 59 %, медиана продолжительности жизни 20,6 мес., при этом вероятность БСВ составила 50 % (рис. 5).

Медиана продолжительности жизни больных, которым была выполнена повторная алло-ТГСК от другого донора по поводу рецидива, составила 10,6 мес., тогда как при алло-ТГСК от того же донора, — лишь 2,2 мес. Однако на вероятность ОВ и БСВ смена донора в группе больных с рецидивом гемобластоза не повлияла (рис. 5).

Вероятность развития острой РТПХ (оРТПХ) после второй алло-ТГСК составила 29 % (рис. 6). оРТПХ была констатирована у 7 из 24 больных: 3 больных из группы несостоятельности трансплантата и 4 больных из группы рецидива заболевания. При сравнении групп больных вероятность развития оРТПХ оказалась выше в группе рецидивов и составила 45 % против лишь 15 % в группе с несостоятельностью трансплантата, однако статистически

эти различия были незначимы ($p = 0,1874$) (рис. 7). Учитывая выполнение второй алло-ТГСК на фоне рецидива гемобластоза, ИСТ у этих больных была редуцирована, что увеличило вероятность развития оРТПХ в этой группе: 3 больным в качестве индукции толерантности на +3, +4 дни вводился циклофосфамид, в случае трансплантации от родственного HLA-идентичного донора 1 больная получала микофенолата мофетил в дозе 3 г/сут. Вероятность развития оРТПХ после второй алло-ТГСК в случае выполнения алло-ТГСК от другого донора оказалась выше, чем при алло-ТГСК от того же донора (50 и 15 % соответственно). Повторная алло-ТГСК от другого донора была выполнена 10 больным, среди которых у 5 отмечено развитие оРТПХ, из них 3 больным в качестве профилактики РТПХ проводилась монотерапия циклофосфамидом.

Посттрансплантационная летальность составила 61,5 %. 6 больных умерли вследствие тяжелых инфекционных осложнений на фоне восстановления

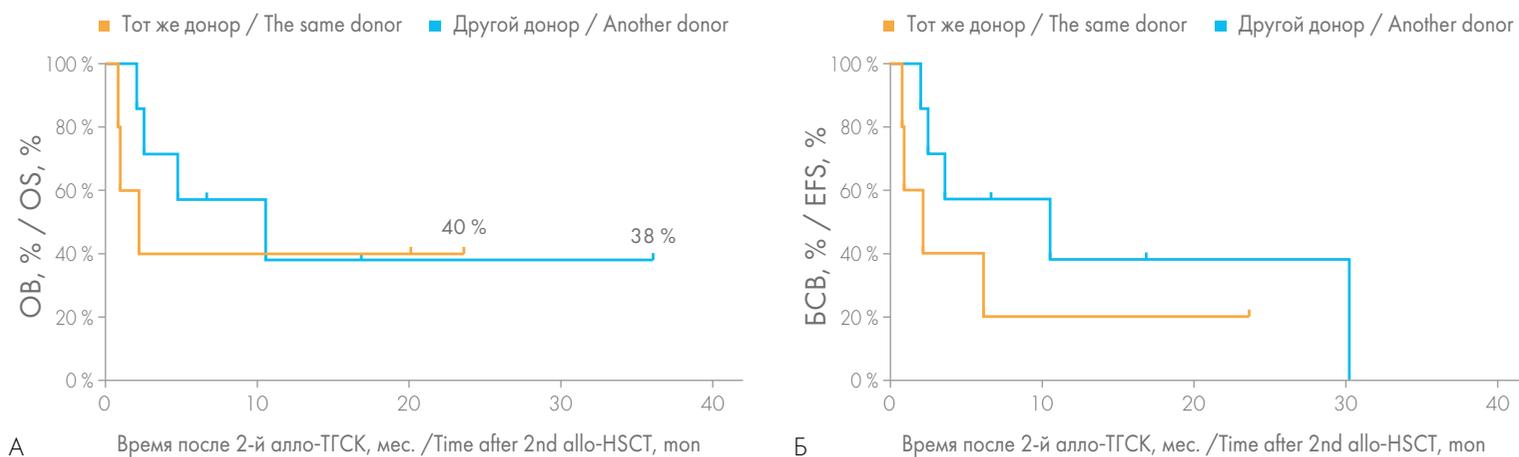


Рисунок 6. Сравнение общей выживаемости (ОВ) (А) и бессобытийной выживаемости (БСВ) (Б) больных при выполнении повторной алло-ТГСК от того же или другого донора у пациентов, которым была выполнена повторная алло-ТГСК по причине рецидива основного заболевания после первой алло-ТГСК
Figure 6. Comparison of the overall survival (OS) (A) and event-free survival (EFS) (B) rates for patients after second allo-HSCT from the same or another donor due to the disease relapse after the first allo-HSCT

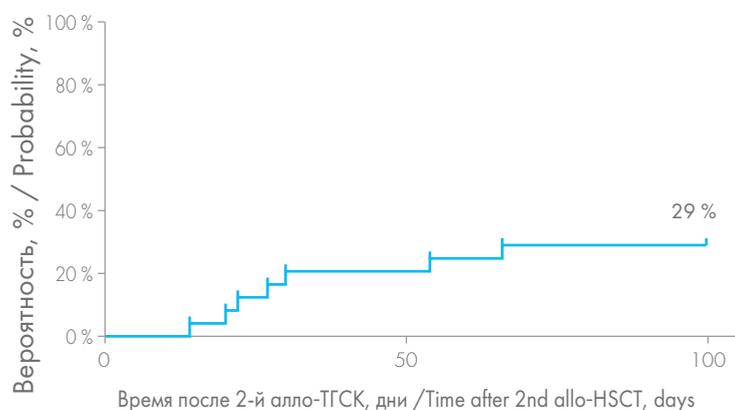


Рисунок 7. Вероятность развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (oРТПХ) после повторной алло-ТГСК
Figure 7. Probability of acute graft-versus-host disease (aGVHD) after second allo-HSCT

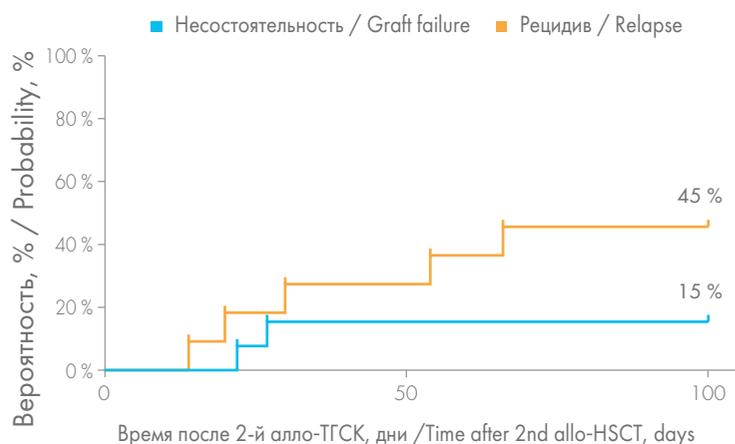


Рисунок 8. Вероятность развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (oРТПХ) после повторной алло-ТГСК в зависимости от причины выполнения второй алло-ТГСК
Figure 8. Probability of acute graft-versus-host disease (aGVHD) after second allo-HSCT depending on the reason for second allo-HSCT

кроветворения или полной ремиссии гемобластоза, у двух из них инфекционные осложнения развились на фоне oРТПХ и терапии преднизолоном. Причиной смерти одного больного стал острый коронарный синдром, возникший через 20 мес. после алло-ТГСК, на момент смерти этот больной находился в ремиссии ОЛЛ, у него было 100 % донорское кроветворение. У 2 больных, которым повторная алло-ТГСК была выполнена в связи с первичным неприживлением трансплантата, не было отмечено восстановления числа лейкоцитов и после второй алло-ТГСК, и они умерли от инфекционных осложнений, возникших во время длительного периода гранулоцитопении. У 3 больных причиной летального исхода стала прогрессия гемобластоза, показанием к выполнению повторной алло-ТГСК этим больным явились резистентные к химиотерапии рецидивы заболевания.

Ко времени анализа результатов 12 (50 %) больных на разных сроках после повторной алло-ТГСК живы, у 3 из них проводится паллиативная терапия в связи с резистентным течением заболевания, у 8 больных сохраняется полная ремиссия на фоне донорского кроветворения, и одна больная находится в ремиссии ОМЛ, несмотря на отторжение трансплантата и восстановление собственного кроветворения (по данным молекулярного исследования химеризма — 100 % ДНК реципиента).

Обсуждение

В настоящее время ТГСК остается одним из немногих методов, позволяющих излечить злокачественные заболевания системы крови, однако в случае неудачи ТГСК, в том числе при развитии несостоятельности трансплантата, отмечается крайне высокая летальность. Варианты дальнейшей терапии весьма ограничены, и повторная алло-ТГСК, особенно при сохранении панцитопении, агранулоцитоза, может являться терапией выбора в кратчайшие

сроки при констатации первичного неприживления трансплантата.

В настоящей работе проанализированы 24 случая повторных алло-ТГСК, выполненных в ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России. ОВ больных после повторной алло-ТГСК составила 38,5 %, БСВ — 27,6 %. Схожие результаты были получены и другими исследователями. В 2015 г. был опубликован ретроспективный анализ вторых трансплантаций, выполненных больным с несостоятельностью трансплантата в клинике Университета Миннесоты. С 2000 по 2013 г. в исследование были включены более 200 человек, однолетняя ОВ составила 44 % [38]. В многоцентровом исследовании EBMT, в которое были включены 2632 больных и анализировались результаты повторной алло-ТГСК, выполненной в связи с рецидивом заболевания, были получены результаты, сопоставимые с результатами, полученными в настоящем исследовании: ОВ в течение 1 года после второй трансплантации составила 40 %, в течение 5 лет — 20 %, БСВ — 33 и 15 % соответственно [18].

Из полученных в настоящей работе данных следует: смена донора незначительно влияет на результаты проведения повторной алло-ТГСК, что подтверждается многими публикациями [50–56]. Таким образом, длительный поиск и активация другого неродственного донора представляется неоправданной, особенно если причиной выполнения повторной алло-ТГСК является первичное неприживление трансплантата, сопровождающееся панцитопенией, агранулоцитозом и высоким риском инфекционных осложнений. В этом случае может быть оправдано проведение алло-ТГСК от другого альтернативного донора, в первую очередь гаплоидентичного, при этом в качестве источника трансплантата лучше использовать гемопоэтические стволовые клетки, так как это дает возможность заго-

товить большее количество клеток-предшественников и добиться быстрого восстановления гемопоэза.

Необходимо признать, что вторая алло-ТГСК сопряжена с высоким риском развития жизнеугрожающих осложнений, во многом обусловленных необходимостью проведения предтрансплантационного кондиционирования, иммуносупрессии на фоне тяжело-го соматического статуса больного и инфекционных осложнений, чем и обусловлена столь высокая летальность больных (61,5 %), преимущественно в ранние сроки (первые 100 дней) после трансплантации, в том числе при восстановлении кроветворения.

Таким образом, на сегодня повторная алло-ТГСК как метод, позволяющий восстановить донорское кроветворение и добиться длительной стойкой ремиссии основного заболевания, все чаще используется в случае неудачи первой алло-ТГСК. Благодаря выполнению повторной алло-ТГСК, по данным ряда многоцентровых исследований, удается достичь 30–40 % ОВ больных [18, 35–40]. В нашем исследовании были получены схожие результаты — ОВ составила 38,5 %. Однако высокая летальность, связанная с лечением, остается нерешенной проблемой, поскольку в большинстве случаев повторная алло-ТГСК выполняется в качестве «терапии спасения» на фоне длительной панцитопении, агранулоцитоза, тяжелых инфекционных осложнений или при возникновении рецидива заболевания. Необходимы дальнейшие клинические исследования по совершенствованию режимов кондиционирования, противовирусной и противогрибковой профилактики, сопроводительной и иммуносупрессивной терапии, а также проведение фундаментальных и клинических исследований, которые могут позволить прогнозировать неприживление трансплантата или добиться быстрого восстановления гемопоэза при проведении повторной алло-ТГСК.

Литература

1. Савченко В.Г., Любимова Л.С., Грибанова Е.О., Кузьмина Л.А. Трансплантация костного мозга больным острыми лейкозами в полной ремиссии и хроническим миелолейкозом в хронической фазе. *Терапевтический архив*. 1999; 71(7): 27–32.
2. Rautenberg C., Germing U., Haas R., et al. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (1): 228–48. DOI: 10.3390/ijms20010228
3. Giebel S., Labopin M., Potter M., et al. Comparable results of autologous and allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for adults with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia in first complete molecular remission: An analysis by the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Eur J Cancer*. 2018; 96: 73–81. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.03.018
4. Schmid C., Wreede L.C., Biezen A., et al. Outcome after relapse of myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia following allogeneic stem cell transplantation: a retrospective registry analysis on 698 patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2018; 103(2): 237–45. DOI: 10.3324/haematol.2017.168716

References

1. Savchenko V.G., Lyubimova L.S., Gribanova E.O., Kuz'mina L.A. Bone marrow transplantation in patients with acute leukemia in complete remission and chronic myelolecrosis in the chronic phase. *Terapevticheskiy arhiv*. 1999; 71(7): 27–32 [In Russian].
2. Rautenberg C., Germing U., Haas R., et al. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (1): 228–48. DOI: 10.3390/ijms20010228
3. Giebel S., Labopin M., Potter M., et al. Comparable results of autologous and allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for adults with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia in first complete molecular remission: An analysis by the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Eur J Cancer*. 2018; 96: 73–81. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.03.018
4. Schmid C., Wreede L.C., Biezen A., et al. Outcome after relapse of myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia following allogeneic stem cell transplantation: a retrospective registry analysis on 698 patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2018; 103(2): 237–45. DOI: 10.3324/haematol.2017.168716

5. Porter D.L., Alyea E.P., Antin J.H., et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the Committee on treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:1467–503. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.08.001
6. Levine J.E., Braun T., Penza S.L., et al. Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 405–12. DOI: 10.1200/JCO.20.2.405
7. Choi S.J., Lee J.H., Kim S., et al. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: A high incidence of isolated extramedullary relapse. *Leukemia.* 2004; 18: 1789–97.
8. Schmid C., Labopin M., Nagler A., et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: A retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 4938–45. DOI: 10.1200/JCO.2007.11.6053
9. Lubbert M., Bertz H., Wasch R., et al. Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45: 627–32.
10. Loren A.W., Porter D.L. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41(5): 483–93. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705898
11. Martino R., Badell I., Brunet S., et al. Second bone marrow transplantation for leukemia in untreated relapse. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14: 589–93.
12. Mrsić M., Horowitz M.M., Atkinson K., et al. Second HLA-identical sibling transplants for leukemia recurrence. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 9: 269–75.
13. Radich J.P., Sanders J.E., Buckner C.D., et al. Second allogeneic marrow transplantation for patients with recurrent leukemia after initial transplant with total-body irradiation-containing regimens. *J Clin Oncol.* 1993; 11: 304–13.
14. Chiang K.Y., Weisdorf D.J., Davies S.M. et al. Outcome of second bone marrow transplantation following a uniform conditioning regimen as therapy for malignant relapse. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17: 39–42.
15. Guièze R., Damaj G., Pereira B., et al. Management of myelodysplastic syndrome relapsing after allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation: a study by the French society of bone marrow transplantation and cell therapies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22(2): 240–7. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.07.037
16. Schmid C., Labopin M., Nagler A., et al. Acute leukaemia working party of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2012; 119(6): 1599–606.
17. Schroeder T, Rachlis E, Bug G., et al. Treatment of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome relapse after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine and donor lymphocyte infusions — a retrospective multicenter analysis from the German cooperative transplant study group. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015; 21(4): 186–93. DOI: 10.1038/bmt.2015.221
18. Wolff S.N. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 545–52. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703389
19. Olsson R., Remberger M. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation.* 2013; 48: 537–43. DOI: 10.1038/bmt.2013.32
5. Porter D.L., Alyea E.P., Antin J.H., et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the Committee on treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:1467–503. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.08.001
6. Levine J.E., Braun T., Penza S.L., et al. Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 405–12. DOI: 10.1200/JCO.20.2.405
7. Choi S.J., Lee J.H., Kim S., et al. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: A high incidence of isolated extramedullary relapse. *Leukemia.* 2004; 18: 1789–97.
8. Schmid C., Labopin M., Nagler A., et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: A retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 4938–45. DOI: 10.1200/JCO.2007.11.6053
9. Lubbert M., Bertz H., Wasch R., et al. Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45: 627–32.
10. Loren A.W., Porter D.L. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41(5): 483–93. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705898
11. Martino R., Badell I., Brunet S., et al. Second bone marrow transplantation for leukemia in untreated relapse. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14: 589–93.
12. Mrsić M., Horowitz M.M., Atkinson K., et al. Second HLA-identical sibling transplants for leukemia recurrence. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 9: 269–75.
13. Radich J.P., Sanders J.E., Buckner C.D., et al. Second allogeneic marrow transplantation for patients with recurrent leukemia after initial transplant with total-body irradiation-containing regimens. *J Clin Oncol.* 1993; 11: 304–13.
14. Chiang K.Y., Weisdorf D.J., Davies S.M., et al. Outcome of second bone marrow transplantation following a uniform conditioning regimen as therapy for malignant relapse. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17: 39–42.
15. Guièze R., Damaj G., Pereira B., et al. Management of myelodysplastic syndrome relapsing after allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation: a study by the French society of bone marrow transplantation and cell therapies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22(2): 240–7. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.07.037
16. Schmid C., Labopin M., Nagler A., et al. Acute leukaemia working party of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2012; 119(6): 1599–606.
17. Schroeder T, Rachlis E, Bug G., et al. Treatment of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome relapse after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine and donor lymphocyte infusions — a retrospective multicenter analysis from the German cooperative transplant study group. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015; 21(4): 186–93. DOI: 10.1038/bmt.2015.221
18. Wolff S.N. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 545–52. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703389
19. Olsson R., Remberger M. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation.* 2013; 48: 537–43. DOI: 10.1038/bmt.2013.32

20. Davies S.M., Kollman C., Anasetti C., et al. Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the National Marrow Donor Program. *Blood*. 2000; 96 (13): 4096–102.
21. Anasetti C., Amos D., Beatty P.G., et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med*. 1989; 320: 197–204. DOI: 10.1056/NEJM198901263200401
22. Rondón G., Saliba R., Khouri I., et al. Long Term Follow Up Of Patients Who Experienced Graft failure Post Allogeneic Progenitor Cell Transplantation. Results of a Single Institution Analysis *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14(8): 859–66. DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.05.005
23. Mattsson J., Ringdén O., Storb A. Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14(Suppl 1): 165–70. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.10.025
24. Remberger M., Ringden O., Ljungman P., et al. Booster marrow or blood cells for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22: 73–8. DOI: 10.1038/sj.bmt.1701290
25. Larocca A., Piaggio G., Podesta M., et al. Boost of CD34+-selected peripheral blood cells without further conditioning in patients with poor graft function following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006; 91: 935–40.
26. Bittencourt H., Rocha V., Filion A., et al. Granulocyte colony-stimulating factor for poor graft function after allogeneic stem cell transplantation: 3 days of G-CSF identifies long-term responders. *Bone Marrow Transplantation*. 2005; 36: 431–5. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705072
27. Nemunaitis J., Singer J.W., Buckner C.D., et al. Use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in graft failure after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990; 76: 245–53.
28. Weisdorf D.J., Verfaillie C.M., Davies S.M., et al. Hematopoietic growth factors for graft failure after bone marrow transplantation: a randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) versus sequential GM-CSF plus granulocyte-CSF. *Blood*. 1995; 85: 3452–6.
29. Remberger M., Mattsson J., Olsson R., et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a treatment for graft failure. *Clin Transplant*. 2011; 25: 68–76. DOI: 10.1111/j.1399-0012.2010.01324.x
30. Schriber J., Agovi M., Ho V., et al. Second unrelated donor hematopoietic cell transplantation for primary graft failure. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 16: 1099–106. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.02.013
31. Kanda J., Horwitz M.E., Long G.D., et al. Outcomes of a 1-day nonmyeloablative salvage regimen for patients with primary graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47: 700–5. DOI: 10.1038/bmt.2011.158
32. Sumi M., Shimizu I., Sato K., et al. Graft failure in cord blood transplantation successfully treated with short-term reduced-intensity conditioning regimen and second allogeneic transplantation. *Int J Hematol*. 2010; 92: 744–50. DOI: 10.1007/s12185-010-0714-6
33. Ayas M., Eapen M., Le-Rademacher J., et al. Second Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Patients with Fanconi Anemia and Bone Marrow Failure. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21(10): 1790–5. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.06.012
34. Horan J.T., Carreras J., Tarima S., et al. Risk factors affecting outcome of second HLA-matched sibling donor transplantations for graft failure in severe acquired aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15: 626–31.
35. Arfons L.M., Tomblyn M., Rocha V., et al. Second hematopoietic stem cell transplantation in myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol*. 2009; 16: 112–23. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283257a87
20. Davies S.M., Kollman C., Anasetti C., et al. Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the National Marrow Donor Program. *Blood*. 2000; 96 (13): 4096–102.
21. Anasetti C., Amos D., Beatty P.G., et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med*. 1989; 320: 197–204. DOI: 10.1056/NEJM198901263200401
22. Rondón G., Saliba R., Khouri I., et al. Long Term Follow Up Of Patients Who Experienced Graft failure Post Allogeneic Progenitor Cell Transplantation. Results of a Single Institution Analysis *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14(8): 859–66. DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.05.005
23. Mattsson J., Ringdén O., Storb A. Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14(Suppl 1): 165–70. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.10.025
24. Remberger M., Ringden O., Ljungman P., et al. Booster marrow or blood cells for graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22: 73–8. DOI: 10.1038/sj.bmt.1701290
25. Larocca A., Piaggio G., Podesta M., et al. Boost of CD34+-selected peripheral blood cells without further conditioning in patients with poor graft function following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006; 91: 935–40.
26. Bittencourt H., Rocha V., Filion A., et al. Granulocyte colony-stimulating factor for poor graft function after allogeneic stem cell transplantation: 3 days of G-CSF identifies long-term responders. *Bone Marrow Transplantation*. 2005; 36: 431–5. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705072
27. Nemunaitis J., Singer J.W., Buckner C.D., et al. Use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in graft failure after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990; 76: 245–53.
28. Weisdorf D.J., Verfaillie C.M., Davies S.M., et al. Hematopoietic growth factors for graft failure after bone marrow transplantation: a randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) versus sequential GM-CSF plus granulocyte-CSF. *Blood*. 1995; 85: 3452–6.
29. Remberger M., Mattsson J., Olsson R., et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a treatment for graft failure. *Clin Transplant*. 2011; 25: 68–76. DOI: 10.1111/j.1399-0012.2010.01324.x
30. Schriber J., Agovi M., Ho V., et al. Second unrelated donor hematopoietic cell transplantation for primary graft failure. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 16: 1099–106. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.02.013
31. Kanda J., Horwitz M.E., Long G.D., et al. Outcomes of a 1-day nonmyeloablative salvage regimen for patients with primary graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47: 700–5. DOI: 10.1038/bmt.2011.158
32. Sumi M., Shimizu I., Sato K., et al. Graft failure in cord blood transplantation successfully treated with short-term reduced-intensity conditioning regimen and second allogeneic transplantation. *Int J Hematol*. 2010; 92: 744–50. DOI: 10.1007/s12185-010-0714-6
33. Ayas M., Eapen M., Le-Rademacher J., et al. Second Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Patients with Fanconi Anemia and Bone Marrow Failure. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21(10): 1790–5. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.06.012
34. Horan J.T., Carreras J., Tarima S., et al. Risk factors affecting outcome of second HLA-matched sibling donor transplantations for graft failure in severe acquired aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15: 626–31.
35. Arfons L.M., Tomblyn M., Rocha V., et al. Second hematopoietic stem cell transplantation in myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol*. 2009; 16: 112–23. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283257a87

36. Byrne B.J., Horwitz M., Long G.D., et al. Outcomes of a second non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation following graft rejection. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41: 39–43.

37. Fernandes J., Rocha V., Robin M., et al. Second transplant with two unrelated cord blood units for early graft failure after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2007; 137: 248–51. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06562.x

38. Lund T.C., Liegel J., Bejanyan N., et al. Second allogeneic hematopoietic cell transplantation for graft failure: Poor outcomes for neutropenic graft failure. *Am. J. Hematol.* 2015; 90: 892–6. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.11.242

39. Andreola G., Labopin M., Beelen D., et al. Long-term outcome and prognostic factors of second allogeneic hematopoietic stem cell transplant for acute leukemia in patients with a median follow-up of greater than or equal to 10 years. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50(12): 1508–12. DOI: 10.1038/bmt.2015.193

40. Ruutu T., de Wreede L.C., van Biezen A., et al. Second allogeneic transplantation for relapse of malignant disease: retrospective analysis of outcome and predictive factors by the EBMT. *Bone Marrow Transplantation.* 2015; 9: 1–9.

Информация об авторах

Кузьмина Лариса Анатольевна*, кандидат медицинских наук, заведующая отделением трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: kuzlara@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>

Копова Зоя Викторовна, врач-гематолог отделения трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: konova.zoya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5569-0155>

Паровичникова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и ТКМ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: parovichnikova@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Дроков Михаил Юрьевич, кандидат медицинских наук, руководитель сектора по изучению иммунных воздействий и осложнений после ТКМ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: mdrokov@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9431-8316>

Васильева Вера Алексеевна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с дневным стационаром, e-mail: vasilievava4@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0904-7385>

Попова Наталья Николаевна, врач-гематолог отделения трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: popova015@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0636-4991>

36. Byrne B.J., Horwitz M., Long G.D., et al. Outcomes of a second non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation following graft rejection. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41: 39–43.

37. Fernandes J., Rocha V., Robin M., et al. Second transplant with two unrelated cord blood units for early graft failure after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2007; 137: 248–51. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06562.x

38. Lund T.C., Liegel J., Bejanyan N., et al. Second allogeneic hematopoietic cell transplantation for graft failure: Poor outcomes for neutropenic graft failure. *Am. J. Hematol.* 2015; 90: 892–6. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.11.242

39. Andreola G., Labopin M., Beelen D., et al. Long-term outcome and prognostic factors of second allogeneic hematopoietic stem cell transplant for acute leukemia in patients with a median follow-up of greater than or equal to 10 years. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50(12): 1508–12. DOI: 10.1038/bmt.2015.193

40. Ruutu T., de Wreede L.C., van Biezen A., et al. Second allogeneic transplantation for relapse of malignant disease: retrospective analysis of outcome and predictive factors by the EBMT. *Bone Marrow Transplantation.* 2015; 9: 1–9.

Information about the authors

Larisa A. Kuzmina, Cand. Sci. (Med.), Head of the Bone Marrow Transplantation Department, National Research Center for Hematology, e-mail: kuzlara@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>

Zoya V. Konova, MD, National Research Center for Hematology, e-mail: konova.zoya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5569-0155>

Elena N. Parovichnikova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Chemotherapy of Hemoblastosis and BMT, National Research Center for Hematology, e-mail: parovichnikova@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Mikhail Yu. Drovkov, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Immunotherapy and Post-BMT complications, National Research Center for Hematology, e-mail: mdrokov@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9431-8316>

Vera A. Vasilyeva, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of High-dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation with an Outpatient Facility, National Research Center for Hematology, e-mail: vasilievava4@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0904-7385>

Natalia N. Popova, MD, National Research Center for Hematology, e-mail: popova015@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0636-4991>

Савченко Валерий Григорьевич, академик Российской академии наук, профессор, доктор медицинских наук, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: svg@blood.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила 14.06.2018

Принята к печати 24.12.2018

Valeriy G. Savchenko, RAS Academician, Dr. Sci. (Med.), Prof., CEO of the National Research Center for Hematology,
e-mail: svg@blood.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

*** Corresponding author**

Received 14 Jun 2018

Accepted 24 Dec 2018

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-49-59>

ОБРАТИМЫЕ И НЕОБРАТИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОСТНО-СУСТАВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ГОШЕ I ТИПА

Соловьева А. А.¹, Яцык Г. А., Пономарев Р. В., Лукина К. А., Костина И. Э., Мамонов В. Е., Лукина Е. А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Болезнь Гоше (БГ) — это аутосомно-рецессивная лизосомная болезнь накопления, обусловленная дефицитом фермента глюкоцереброзидазы, который участвует в деградации гликофинголипидов. Поражение костно-суставной системы является одним из основных проявлений заболевания и наблюдается у 70–100 % больных. Редкость БГ, неспецифические и гетерогенные клинические проявления, а также сложная лучевая семиотика могут затруднять дифференциальную диагностику БГ с рядом других заболеваний.

Цель исследования: представить лучевую семиотику обратимых и необратимых изменений костно-суставной системы при БГ I типа и определить роль магнитно-резонансной томографии (МРТ) в диагностике и оценке степени тяжести поражения костно-суставной системы у больных БГ I типа.

Материалы и методы. Ретроспективно проанализированы данные рентгенограмм и МР-томограмм бедренных костей с захватом тазобедренных и коленных суставов 86 больных с диагнозом БГ I типа. Исследования были выполнены до начала специфической терапии. Оценивалось специфическое вовлечение костного мозга в патологический процесс. Определялись изменения костей и суставов, параартикулярных структур и мягких тканей.

Результаты. Показан спектр изменений костно-суставной системы у больных БГ I типа. Установлено, что при БГ поражение костей может носить обратимый и необратимый характер. МРТ является чувствительным методом диагностики обратимых изменений костной системы при БГ.

Заключение. Лучевая семиотика поражений костно-суставной системы у больных БГ типичная и вместе с тем крайне вариабельная. МРТ является «золотым стандартом» современной диагностики поражения костей при БГ.

Ключевые слова: болезнь Гоше, поражение костно-суставной системы, обратимые и необратимые изменения, МРТ

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Соловьева А.А., Яцык Г.А., Пономарев Р.В., Лукина К.А., Костина И.Э., Мамонов В.Е., Лукина Е.А. Обратимые и необратимые изменения костно-суставной системы при болезни Гоше I типа. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 49–59. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-49-59>

REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE RADIOLOGICAL SIGNS OF BONE INVOLVEMENT IN TYPE I GAUCHER DISEASE

Soloveva A. A.*, Yatsyk G. A., Ponomarev R. V., Lukina K. A., Kostina I. E., Mamonov V. E., Lukina E. A.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Gaucher disease is an autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by deficiency of the enzyme glucocerebrosidase, which is required for the degradation of glycosphingolipids. Skeletal involvement is one of the main manifestations of the disease and is present in 70–100 % of patients. However, the rarity of Gaucher disease and non-specific and heterogeneous nature of its symptoms and radiological signs may impede consideration of this disease in the differential diagnosis.

Aim. To describe the radiological signs of bone involvement in type I Gaucher disease and assess the role of MRI in the evaluation of the severity of the disease in newly diagnosed patients.

Materials and methods. X-ray and MRI data of 86 treatment-naïve Gaucher patients were included in the retrospective analysis. Bone marrow involvement, as well as bone and joint pathological changes, were evaluated.

Results. Radiological signs of bone involvement in Gaucher patients were described and classified into 2 groups, i.e. reversible and irreversible. Such a classification is important in terms of the assessment of the overall disease severity. MRI has proven to be a sensitive method for detection and evaluation of the reversible bone changes in Gaucher patients.

Conclusion. Although radiological manifestations of bone involvement in Gaucher patients are typical, they may significantly vary and be present in various combinations. MRI is the gold standard for the assessment of bone marrow changes in patients with Gaucher disease.

Keywords: Gaucher disease, bone involvement, reversible and irreversible radiological signs, MRI

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Soloveva A. A., Yatsyk G. A., Ponomarev R. V., Lukina K. A., Kostina I. E., Mamonov V. E., Lukina E. A. Reversible and irreversible radiological signs of bone involvement in type I Gaucher disease. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 49–59 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-49-59>

Введение

Болезнь Гоше (БГ) — наиболее частая форма наследственных ферментопатий, объединенных в группу лизосомных болезней накопления. В основе заболевания лежит наследственный дефицит активности кислой β -глюкозидазы (глюкоцеребросидазы, ГЦБ) — лизосомного фермента, участвующего в деградации продуктов клеточного метаболизма [1–3]. Заболевание встречается с частотой от 1:40 000 до 1:60 000 у представителей всех этнических групп; в популяции евреев-ашкенази частота заболевания достигает 1:450–1:1000 [4].

БГ впервые была описана в 1882 г. французским врачом Philippe С.Е. Gaucher, который выделил патогномичные для данного заболевания клетки — макрофаги, накапливающие липиды, позднее названные клетками Гоше. В 1901 г. БГ квалифицировали как лизосомную болезнь накопления с аутосомно-рецессивным типом наследования. В 1965 г. было установлено, что причиной заболевания является врожденный дефицит ГЦБ — лизосомного фермента, участвующего в расщеплении гликофинголипидов мембран разрушающихся клеток, в частности глюкоцереброзида [3, 4].

БГ наследуется по аутосомно-рецессивному механизму. Присутствие двух мутантных аллелей гена ГЦБ ассоциировано со снижением (или отсутствием) каталитической активности ГЦБ, что приводит к накоплению в цитоплазме клеток неутилизованных липидов [3].

ГЦБ содержится во всех клетках организма, однако дефицит этого фермента имеет наибольшее значение для антигенперерабатывающих макрофагов, поскольку важная функция этих клеток-«мусорщиков» состоит в деградации клеток крови (лейкоцитов, эритроцитов), закончивших свой жизненный цикл. Отсутствие ГЦБ или низкая активность фермента приводят к накоплению в лизосомах макрофагов неутилизованных липидов и образованию характерных клеток накопления (клеток Гоше) [3–5].

Накопление в цитоплазме макрофагов нерасщепленных продуктов метаболизма сопровождается продукцией этими клетками провоспалительных цитокинов, аутокринной стимуляцией моноцитопоэза (продукция моноцитов — клеток-предшественников макрофагов — в костном мозге) и увеличением абсолютного количества макрофагов в местах их «физиологического дома» (селезенка, печень, костный мозг, легкие), что проявляется гепато- и спленомегалией, инфильтрацией макрофагами костного мозга, легких и других органов [5, 6].

Патогенез многообразных клинических проявлений БГ прежде связывали с накоплением в органах и тканях перегруженных липидами макрофагов, механическим замещением и нарушением нормальной структуры тканей клетками Гоше. Согласно современной концепции, в основе заболевания лежит не столько механическое накопление «переполненных продуктами деградации» макрофагов в органах и тканях, сколько активация и расстройства многочисленных функций этих клеток, в том числе нарушение регуляции кровотока и метаболизма костной ткани, что, предположительно, лежит в основе цитопенического синдрома и поражения костной системы [5].

БГ I типа — наиболее частый клинический вариант заболевания, встречается как у детей, так и взрослых. Средний возраст больных ко времени манифестации заболевания варьирует от 30 до 40 лет. Трудности при раннем выявлении заболевания обусловлены вариабельностью клинических проявлений на ранних стадиях болезни, а также их малой специфичностью [7]. Основные симптомы БГ включают спленомегалию, гепатомегалию, цитопению, поражение костно-суставной системы. Поражение костной системы при БГ I типа встречается в 70–100 % случаев. Преимущественно поражаются длинные трубчатые кости и позвоночник. При этом отмечается исключительная гетерогенность характера и степени выраженности изменений костно-суставной системы, причина которой до настоящего времени остается неясной [7, 8].

Помимо этого, трудности вызывает как первичная, так и дифференциальная диагностика БГ с рядом других гематологических, онкологических и соматических заболеваний. Связано это с неспецифическими клиническими проявлениями и сходной лучевой семиотикой этих заболеваний [9].

Основой современной диагностики БГ является биохимический анализ активности ГЦБ в лейкоцитах крови. Диагноз подтверждают лабораторно при снижении активности фермента менее 30 % от нормального значения [10]. Степень снижения активности фермента не коррелирует с тяжестью клинических проявлений и течения заболевания [3]. Современное лечение БГ заключается в назначении пожизненной заместительной ферментной терапии (ЗФТ) рекомбинантной ГЦБ [5, 10]. Таким образом, очевидна необходимость полноценного клинико-лабораторного обследования таких больных, а также использование комплекса методов лучевой диагностики для оценки степени тяжести поражения костно-суставной системы [11].

Цель работы — представить лучевую семиотику обратимых и необратимых изменений костно-суставной системы при БГ I типа и определить роль магнитно-резонансной томографии (МРТ) в диагностике и оценке степени тяжести поражения костно-суставной системы у больных БГ I типа.

Материалы и методы

Проведен анализ данных лучевых исследований, выполненных у больных БГ I типа, которые находились на лечении в отделении орфанных заболеваний ФГБУ НМИЦ гематологии МЗ РФ с 2010 по 2018 г. В исследование включены 86 больных, из них 39 мужчин и 47 женщин в возрасте от 25 до 84 лет (медиана возраста — 37 лет). У всех больных диагноз был подтвержден ферментной диагностикой. Обследование больных в ФГБУ НМИЦ гематологии МЗ РФ проводилось до начала специфической терапии.

Комплексное лучевое обследование больных с лабораторно подтвержденной БГ I типа начинали с проведения классической рентгенографии. Выполняли рентгенографию бедренных костей с захватом тазобедренных и коленных суставов в прямой проекции. Исследования проводились на рентгенодиагностических системах Prestige SI и Proteus XR/a фирмы General Electric. Вторым этапом выполняли МРТ бедренных костей с захватом тазобедренных и коленных суставов согласно разработанному и введенному в практику протоколу: плоскость сканирования — корональная; толщина сканируемого слоя — 4 мм; импульсные последовательности: T1SE, T2SE, STIR. Исследования проводились на двух магнитно-резонансных томографах: Signa Profile фирмы General Electric (США) с индукцией магнитного поля 0,23 Т с использованием катушек Body Flex Coil (M и L), Ingenia фирмы Philips (Нидерланды) с индукцией магнитного

поля 1,5 Т с использованием катушек dStream Anterior, dStream Posterior.

Результаты

Рентгенография

Классическую рентгенографию использовали для первичной оценки структурных изменений костей, что позволило установить грубые патологические изменения костно-суставной системы при БГ, преимущественно необратимого характера:

- 1) деформацию костей по типу колб Эрленмейера;
- 2) неоднородность костной структуры;
- 3) асептические некрозы головок бедренных костей;
- 4) патологические переломы.

1. Деформация костей по типу колб Эрленмейера

Представляет собой заметное расширение костномозгового канала дистальных отделов бедренных и проксимальных отделов большеберцовых костей с истончением коркового слоя изнутри вследствие нарушения ремоделирования костной ткани (рис. 1). Деформация костей по типу колб Эрленмейера выявлена у 97 % больных.

2. Неоднородность костной структуры

Структура костей при БГ различной степени выраженности была разрежена за счет проявления остеопении и общего остеопороза. Внутренние контуры кортикального слоя становились слегка смазанными, наружные оставались гладкими. Главным образом в губчатых концах длинных костей выявлялись небольшие очаговые округлые и овальные ограниченные просветления, окруженные реактивными уплотнениями — склеротическими участками, в результате чего кость приобретала широкопетлистую или пятнисто-поротическую структуру. Иногда данные очаги остеолитического сливались в более крупные дефекты, отделенные друг от друга перекладинами, косо и поперечно пересекающими кость, и рисунок становился крупноочаговым (рис. 2). Вышеописанные изменения встречались у 57 % обследованных больных.

3. Асептические некрозы головок бедренных костей

Часто структурные изменения определялись в головке и шейке бедренной кости (табл. 1). В тяжелых случаях деструктивные явления были настолько резко выражены, что головка разрушилась, что было выявлено в 26 % случаев. В результате отмечалась ее грибовидная деформация с укорочением шейки бедренной кости, что сопровождалось развитием вторичного остеоартроза тазобедренного сустава (рис. 3).

4. Патологические переломы

Вследствие истончения кортикального слоя больших трубчатых костей течение БГ в 8 % случаев осложнялось патологическими переломами, которым чаще всего подвергались проксимальные отделы бедренных костей (рис. 4).



Рисунок 1. Рентгенограмма бедренных костей в прямой проекции. Булавовидная деформация дистальных метадиафизов бедренных костей с расширением костномозговых каналов по типу колб Эрленмейера

Figure 1. Plain radiograph of femurs in direct projection. Erlenmeyer flask deformity of femurs



Рисунок 2. Рентгенограммы бедренных костей в прямых проекциях. Костная структура дистальных отделов бедренных костей очагово разрежена с чередованием склеротического компонента. Деформирована по крупноочаговому (а) и пятнисто-поротическому типам (б)

Figure 2. Plain radiographs of femurs in direct projections. Bone structure of distal femurs discharged by foci with alternation of the sclerotic component. Deformed by coarse (a) and spotty-porotic types (b)



Рисунок 3. Рентгенограмма тазобедренных суставов в прямой проекции. Асептический некроз головки правой бедренной кости в стадии исхода. Вторичный остеоартроз правого тазобедренного сустава

Figure 3. Plain radiograph of hips in direct projection. Osteonecrosis of right femoral head. Secondary osteoarthritis of right hip joint



Рисунок 4. Рентгенограмма проксимального отдела правой бедренной кости в прямой проекции. Патологический подвертельный перелом бедренной кости с поперечным смещением и частичным вклиниванием отломков

Figure 4. Plain radiograph of proximal right femur in direct projection. Pathological subtrochanteric fracture of the femur with a transverse displacement and partial penetrations of fragments

В таблице 1 представлена частота встречаемости необратимых изменений костно-суставной системы у 86 обследованных больных БГ.

Магнитно-резонансная томография

МРТ позволяет оценить состояние костного мозга у взрослых больных БГ, а также выявить:

- 1) инфильтрацию костного мозга клетками Гоше;
- 2) трабекулярный отек, медуллярный и кортико-медуллярный остеонекроз как проявления ишемии костного мозга;
- 3) остеосклероз;
- 4) остеолизис.

1. Инфильтрация костного мозга клетками Гоше

Специфическая инфильтрация костного мозга клетками Гоше носила как очаговый, так и диффузный

Таблица 1. Изменения костей (по данным рентгенографии, n = 86)

Table 1. Bone changes (according to X-ray, n = 86)

№	Вид изменений Type of changes	Количество больных (%) Number of patients (%)
1	Деформация по типу колб Эрленмейера Erlenmeyer flask deformity	83 (97)
2	Неоднородность костной структуры Heterogeneity of bone structure	49 (57)
3	Асептический некроз головок бедренных костей Osteonecrosis of femoral heads	22 (26)
4	Патологические переломы Pathological fracture	7 (8)



Рисунок 5. МРТ бедренных костей в корональной проекции (T1-ВИ режим). Выраженная инфильтрация костного мозга бедренных костей и костей таза. Гомогенный тип. Распространенность — 4 области

Figure 5. MRI of femurs in coronal projection (T1-WI). Expressed bone marrow infiltration of femurs and pelvic bones. Homogenous type. Prevalence — 4 areas

характер и на МРТ проявлялась изменением интенсивности сигнала с повышенного на гипоинтенсивный в T1- и T2-взвешенных изображениях (ВИ) (рис. 5). Встречалась у 95 % нелеченых больных, включенных в исследование. Степень распространенности, выраженности и характер инфильтрации костного мозга значительно варьировали.

МРТ позволила провести динамический контроль за состоянием костного мозга у больных старше 25 лет. На фоне проводимой ЗФТ структура вещества костного мозга восстанавливалась, происходило увеличение процентного содержания жира, что подтверждается повышением интенсивности МР-сигнала от костного мозга (рис. 6).

2. Трабекулярный отек, медуллярный и кортико-медуллярный остеонекроз как проявления ишемии костного мозга

На МРТ участки трабекулярного отека костного мозга (обратимая фаза ишемии) визуализировались в 27 % случаев, характеризовались промежуточной интенсивностью сигнала в T1-ВИ и гиперинтенсивным сигналом в T2-ВИ, последовательностях Stir (рис. 7).

Необратимые ишемические изменения костного мозга у больных определялись в эпифизах (асептический или кортико-медуллярный остеонекроз), а также в метафизах и диафизах костей (медуллярный остеонекроз). МР-признаки остеонекроза варьировали в зависимости от стадии патологического процесса и встречались у 55 % больных. Для необратимой фазы специфична картина поражения, к которой были отнесены хорошо видимые в T1- и в T2-ВИ гипоинтенсивные линии, своей конфигурацией напоминающие географическую карту. Чаще всего

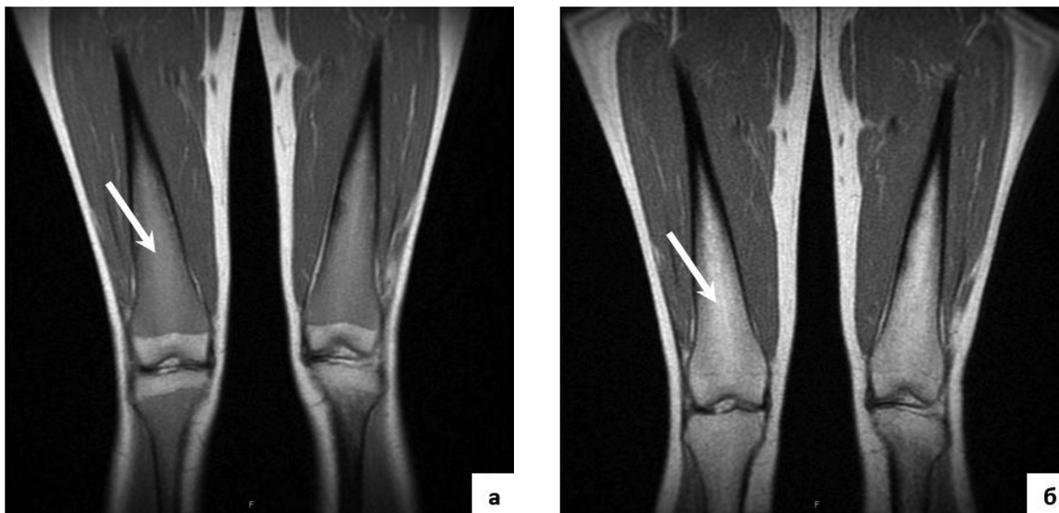


Рисунок 6. МРТ бедренных костей в корональной проекции (а, б: T1-ВИ режим). Инфильтрация костного мозга клетками Гоше до лечения (а) и полный ее регресс через 5 лет терапии (б)

Figure 6. MRI of femurs in coronal projection (a, б: T1-WI). Bone marrow infiltration by Gauche cells before treatment (a) and its complete regression after 5 years of treatment (б)

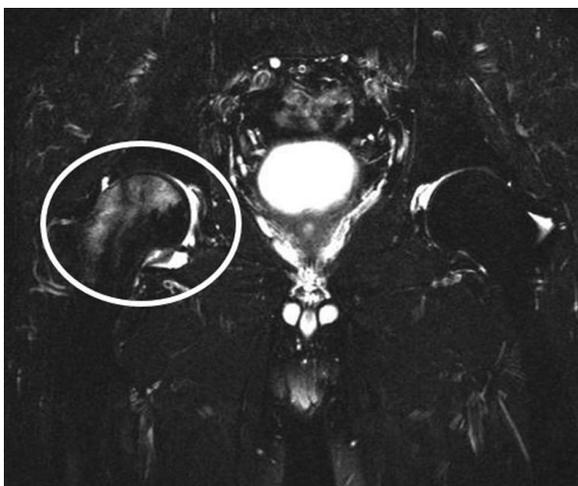


Рисунок 7. МРТ тазобедренных суставов в корональной проекции (режим Stir). Отек костного мозга головки и шейки правой бедренной кости

Figure 7. MRI of hip joints in coronal projection (Stir). Bone marrow edema of head and neck right femur

при БГ поражались головки бедренных костей, дистальные отделы бедренных и проксимальные отделы большеберцовых костей (рис. 8, 9). Кортико-медуллярный остеонекроз выявлен у 28 % больных, медуллярный — у 53 %.

Выпот в полость сустава обычно отмечался в случаях, когда некрозу подвергались эпифизы костей, образующих сустав. При этом кортикальный слой, покрывающий некротический участок костного мозга, истончался с развитием вдавленного субхондрального перелома. В дальнейшем происходило полное отделение секвестра от эпифиза кости линией высокой интенсивности на T2-ВИ и низкой на T1-ВИ, что соответствовало стадии фрагментации (рис. 10). Стадия исхода кортико-медуллярного остеонекроза характеризовалась преобладанием деформирующих изменений с формированием вторичного остеоартроза и была выявлена у 26 % больных (рис. 11).

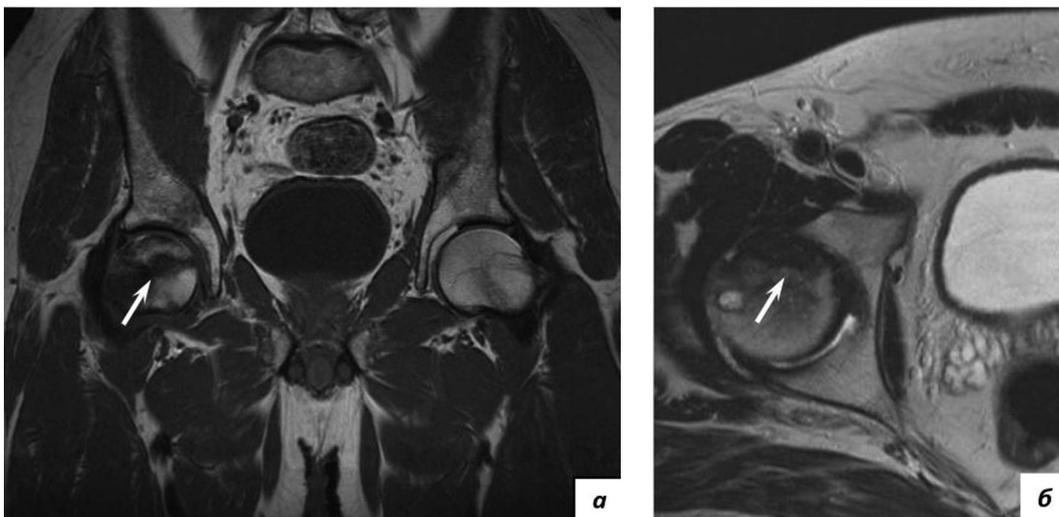


Рисунок 8. МРТ тазобедренных суставов в корональной (а: T1-ВИ режим) и аксиальной (б: T2-ВИ режим) проекциях. Кортико-медуллярный остеонекроз в головке правой бедренной кости. Секвестрация некротического участка

Figure 8. MRI of hip joints in coronal (a: T1-WI) and transversal (б: T2-WI) projections. Cortico-medullary osteonecrosis in right femoral head. Sequestration of necrotic area

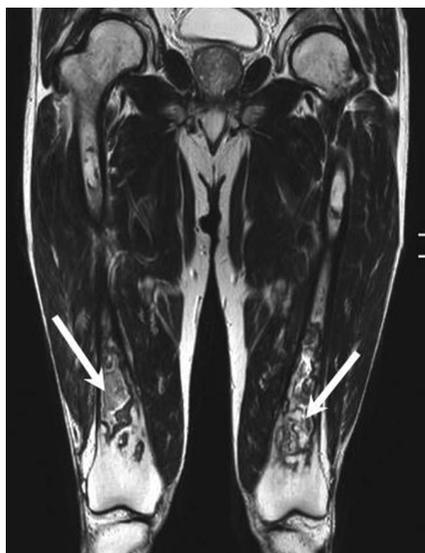


Рисунок 9. МРТ бедренных костей в коронарной проекции (режим T2-ВИ). Медулярный остеонекроз в диафизах бедренных костей

Figure 9. MRI of femurs in coronal projection (T2-WI). Medullary osteonecrosis in diaphysis of femurs

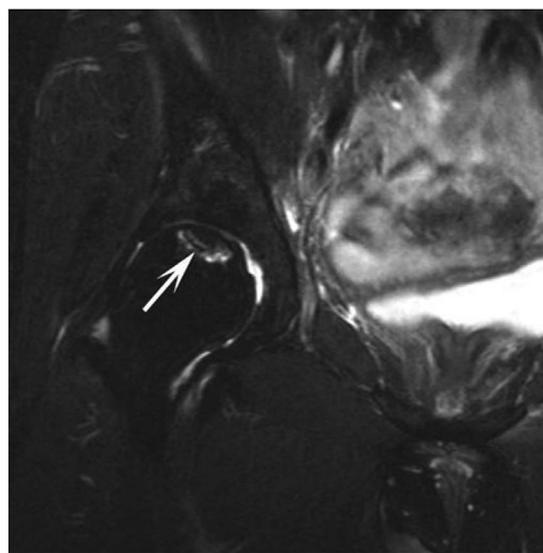


Рисунок 10. МРТ правого тазобедренного сустава в коронарной проекции (режим Stir). Субхондрально расположенный некротический фрагмент в головке бедренной кости

Figure 10. MRI of right hip joint in coronal projection (Stir). Subchondral necrotic fragment located in femoral head



Рисунок 11. МРТ тазобедренных суставов в коронарной проекции (T2-ВИ режим). Асептический некроз головки правой бедренной кости в стадии исхода; вторичный остеоартроз правого тазобедренного сустава

Figure 11. MRI of hip joints in coronal projection (T2-WI). Osteonecrosis of right femoral head. Secondary osteoarthritis of right hip joint



Рисунок 12. МРТ бедренных костей в коронарной проекции (T1-ВИ режим). Участки постинфарктного остеосклероза в диафизах и дистальных метафизах бедренных костей

Figure 12. MRI of femurs in coronal projection (T1-WI). Areas of postinfarction osteosclerosis in diaphysis and distal metaphysis of femurs

3. Остеосклероз

В 12 % случаев распространенный остеонекроз приводил к формированию постинфарктного остеосклероза костного мозга, который на МР-томограммах визуализировался в виде гипоинтенсивных зон во всех импульсных последовательностях (рис. 12).

4. Остеолизис

Истончение костной ткани при БГ приводило к деструкции кости и сопровождалось формированием участков остеолизиса, которые по лучевым признакам были похожи на солитарные костные кисты. У 7 % больных на МР-томограммах визуализировались участки овальной вытянутой формы, которые были

четко ограничены от окружающей костной ткани низкоинтенсивной полоской эндостальной оссификации. Структура полостей была однородной или ячеисто-трабекулярной с наличием содержимого жидкостного или геморрагического характера (рис. 13).

Описанные структурные изменения костей встречались как изолированно, так и в различных сочетаниях. В соответствии с анализом МР-томограмм обследованных по специализированному формализованному протоколу больных были получены следующие данные.

1. Обратимые изменения костно-суставной системы выявили у 82 (95 %) больных (табл. 2). Сочетание



Рисунок 13. МРТ бедренных костей в корональной проекции (T2-ВИ режим). Массивный участок остеолитического разрушения в дистальном метадиафизе левой бедренной кости
Figure 13. MRI of femur in coronal projection (T2-WI). Huge area of osteolysis in distal metadiaphysis of left femur

Таблица 2. Обратимые изменения (по данным МРТ, n = 86)
Table 2. Reversible changes (according to MRI, n = 86)

№	Вид изменений Type of changes	Количество больных (%) Number of patients (%)
1	Инфильтрация костного мозга Bone marrow infiltration	82 (95)
	Тип Type	
	гомогенная homogeneous	71 (82)
	гетерогенная heterogeneous	11 (13)
	Степень выраженности Severity	
	выраженная expressed	25 (29)
	умеренно выраженная moderately expressed	43 (50)
	слабовыраженная weakly expressed	14 (16)
	Распространенность (модифицированная шкала Дюссельдорфа) Prevalence (modified Düsseldorf score)	
	1 область 1 area	1 (1)
	2 области 2 areas	4 (5)
	3 области 3 areas	0
	4 области 4 areas	39 (45)
	5 областей 5 areas	1 (1)
6 областей 6 areas	37 (43)	
2	Трабекулярный отек костного мозга Tabecular bone marrow edema	23 (27)

инфильтрации костного мозга с трабекулярным отеком обнаружили у 27 % больных.

2. Необратимые изменения костно-суставной системы имели место у 83 (97 %) больных (табл. 3). Сочетание различных видов необратимых изменений обнаружили у 49 (57 %) больных. Наиболее часто встречались следующие сочетания:

- а) деформация по типу колб Эрленмейера + медуллярный остеонекроз — 46 (53 %) больных;
- б) деформация по типу колб Эрленмейера + кортико-медуллярный остеонекроз + вторичный остеоартроз — 22 (26 %) больных;
- в) деформация по типу колб Эрленмейера + медуллярный/кортико-медуллярный остеонекроз + остеосклероз — 10 (12 %) больных.

По данным анализа МР-томограмм у 3 из 86 больных патологические изменения костно-суставной системы отсутствовали. Остальные больные (n = 83) были разделены на 4 группы в зависимости от степени тяжести поражения костно-суставной системы:

- 1) легкое поражение костей — 34 (40 %) больных;
- 2) умеренно тяжелое — 26 (30 %) больных;
- 3) тяжелое поражение костей — 21 (24 %) больной;
- 4) сверхтяжелое поражение костей — 2 (2 %) больных.

Обсуждение

Анализ накопленных данных показал многообразие лучевой семиотики поражения костной системы при БГ I типа. Поражение костно-суставной системы является типичным проявлением БГ и варьирует

Таблица 3. Необратимые изменения (по данным МРТ, n = 86)
Table 3. Irreversible changes (according to MRI, n = 86)

№	Вид изменений Type of changes	Количество больных (%) Number of patients (%)
1	Деформация по типу колб Эрленмейера Erlenmeyer flask deformity	83 (97)
2	Остеонекроз Osteonecrosis	47 (55)
		медуллярный medullary
	кортико-медуллярный cortico-medullary	23 (28)
3	Вторичный остеоартроз Secondary osteoarthritis	22 (26)
4	Остеосклероз Osteosclerosis	10 (12)
5	Остеолизис Osteolysis	6 (7)
6	Патологический перелом Pathological fracture	7 (8)

от бессимптомной инфильтрации костного мозга, остеопении до тяжелейшего остеопороза с патологическими переломами и асептическими некрозами костей, ведущими к развитию вторичных остеоартрозов и, как следствие, необратимых ортопедических дефектов [12]. Возможно развитие тяжелых сопутствующих заболеваний (например, костно-суставной туберкулез) [13], жизненно опасных осложнений в виде тотальной деструкции костной ткани с множественными патологическими переломами [14]. По данным Международного регистра БГ [7], включающего 2004 больных из 39 стран, наиболее частыми симптомами вовлечения костной системы были деформация костей по типу колб Эрленмейера (61 %), инфильтрация костного мозга (59 %) и остеопения (50 %). Несколько реже встречались медуллярные (35 %) и кортико-медуллярные (34 %) остеонекрозы, патологические переломы (26 %).

Основная роль в оценке тяжести поражения костно-суставной системы при БГ принадлежит лучевым методам диагностики. По характеру поражения костей в настоящей работе были выделены обратимые и необратимые изменения. К обратимым изменениям отнесли инфильтрацию костного мозга клетками Гоше, которая может ассоциироваться с развитием остеопении и остеопороза, а также отеком костного мозга. К необратимым: остеонекрозы, очаги остеолизиса, остеосклероз, патологические переломы и деформации костей, вторичную артропатию. Деформация костей по типу колб Эрленмейера носит необратимый характер, но не имеет клинического и прогностического значения [3], поэтому не рассматривалась как критерий тяжести поражения костно-суставной системы при БГ.

Для характеристики степени тяжести поражения костно-суставной системы при БГ мы разработали следующие критерии [15].

1. Легкое поражение костей:

- инфильтрация и/или отек костного мозга бедренных костей.

2. Умеренно тяжелое:

- инфильтрация и/или отек костного мозга бедренных костей;

Литература

1. Краснополская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. М.: Медицина; 2005.
2. Воробьев А.И., редактор. Руководство по гематологии. М.: Ньюдиамед; 2003.
3. Grabowski GA. Recent clinical progress in Gaucher disease. *Current opinion in pediatrics*. 2005; 17(4): 519–24.
4. Futerman A.H., Zimran A. Gaucher Disease. Taylor and Francis Group, LLC; 2007.
5. Лукина Е.А. Болезнь Гоше. М.: Литтерра; 2011.
6. Zimran A., Kay A., Gelbart T., et al. Gaucher disease. Clinical, laboratory,

- участки медуллярного остеонекроза бедренных костей.

3. Тяжелое поражение костей:

- инфильтрация и/или отек костного мозга бедренных костей;

- участки медуллярного остеонекроза бедренных костей;

- участки кортико-медуллярного остеонекроза бедренных костей с развитием вторичного остеоартроза;

- остеосклероз;

- остеолизис;

- единичные патологические переломы.

4. Сверхтяжелое поражение костей:

- инфильтрация и/или отек костного мозга бедренных костей;

- участки медуллярного остеонекроза бедренных костей;

- участки кортико-медуллярного остеонекроза бедренных костей с развитием вторичного остеоартроза;

- остеосклероз;

- остеолизис;

- множественные патологические переломы.

Приведенные выше критерии показывают, что степень тяжести поражения костно-суставной системы определяется преимущественно наличием необратимых изменений, которые, в свою очередь, определяют тяжесть течения БГ I типа и качество жизни больных.

Таким образом, лучевая семиотика поражений костно-суставной системы у больных БГ достаточно типичная и вместе с тем крайне вариабельная, что обусловлено разнообразием проявлений от легких, обратимых, до крайне тяжелых, необратимых изменений. МРТ является «золотым стандартом» современной диагностики поражения костей при БГ, так как позволяет объективно оценивать вовлечение костного мозга и степень тяжести поражения костно-суставной системы у больных БГ. Продемонстрирована высокая чувствительность данного метода в выявлении обратимых изменений костной системы, которые невозможно визуализировать с помощью классической рентгенографии. Ранняя диагностика и своевременно начатая терапия позволяют предотвратить развитие необратимых ортопедических дефектов, определяющих качество жизни больных БГ I типа.

References

1. Krasnopol'skaya K.D. Hereditary metabolic diseases. Moscow: Medicina; 2005 (In Russian).
2. Vorob`ev A.I., editor. Guide on hematology. Moscow: Newdiamed; 2003 (In Russian).
3. Grabowski G.A. Recent clinical progress in Gaucher disease. *Current opinion in pediatrics*. 2005; 17(4): 519–24.
4. Futerman A.H., Zimran A. Gaucher Disease. Taylor and Francis Group, LLC; 2007.
5. Lukina E.A. Gaucher Disease. Moscow: Litterra; 2011 (In Russian).
6. Zimran A., Kay A., Gelbart T., et al. Gaucher disease. Clinical, laboratory,

- radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1992; 71(6): 337–53.
7. Wenstrup R.J., Roca-Espiau M., Weinreb N.J., Bembi B. Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *Brit. J. Radiology*. 2002; 75(1): 2–12. DOI: 10.1259/bjr.75.suppl_1.750002
8. Blass-Jaimes P. Bone manifestations of Gaucher's disease in Mexican patients: a review. *Acta ortopédica Mexicana*. 2010; 24(5): 349–56.
9. Grabowski G.A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*. 2008; 372(9645): 1263–71.
10. Lukina E., Watman N., Arreguin E.A., et al. Improvement in hematological, visceral, and skeletal manifestations of Gaucher disease type 1 with oral eliglustat tartrate (Genz-112638) treatment: 2 year results of a phase 2 study. *Blood*. 2010; 116(20): 4095–8.
11. Лукина Е.А., Сысоева Е.П., Яцык Г.А. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Гоше. 2014; 13–4.
12. Maas M., Poll L.W., Terk M.R. Imaging and quantifying skeletal involvement in Gaucher disease. *Br J Radiol*. 2002; 75: 13–24. DOI: 10.1259/bjr.75.suppl_1.750013
13. Лукина Е.А., Мамонов В.Е., Лукина К.А. и др. Туберкулезный сакроилеит у пациента с болезнью Гоше. *Терапевтический архив*. 2013; 7: 87–9.
14. Pastores G.M., Patel M.J., Firooznia H. Bone and joint complications related to Gaucher disease. *Curr Rheumatol Rep*. 2000; 2: 175–80.
15. Lukina K., Yatsyk G., Mamonov V., et al. Radiological assessment of the severity of bone involvement in patients with Gaucher disease. *Poster of Congress ECR*. 2014. DOI: 10.1594/ecr2014/C-2383

Информация об авторах

Соловьева Анастасия Александровна*, аспирант, врач-рентгенолог отделения магнитно-резонансной томографии и ультразвуковой диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: solov136@mail.ru, тел.: +7 (915)-488-94-18; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5112-3594>

Яцык Галина Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением магнитно-резонансной томографии и ультразвуковой диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: galina.yatsyk@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8589-6122>

Пономарев Родион Викторович, аспирант, врач-гематолог отделения орфанных заболеваний ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: ponomarev.r.v@icloud.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1218-0796>

Лукина Кира Анатольевна, кандидат медицинских наук, врач-гематолог отделения орфанных заболеваний ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: kira1404@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6757-985X>

- radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1992; 71(6): 337–53.
7. Wenstrup R.J., Roca-Espiau M., Weinreb N.J., Bembi B. Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *Brit. J. Radiology*. 2002; 75(1): 2–12. DOI: 10.1259/bjr.75.suppl_1.750002
8. Blass-Jaimes P. Bone manifestations of Gaucher's disease in Mexican patients: a review. *Acta ortopédica Mexicana*. 2010; 24(5): 349–56.
9. Grabowski G.A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*. 2008; 372(9645): 1263–71.
10. Lukina E., Watman N., Arreguin E.A., et al. Improvement in hematological, visceral, and skeletal manifestations of Gaucher disease type 1 with oral eliglustat tartrate (Genz-112638) treatment: 2 year results of a phase 2 study. *Blood*. 2010; 116(20): 4095–8.
11. Lukina E.A., Sysoeva E.P., Yatsik G.A., et al. Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of Gaucher's disease. 2014: 13–4 (In Russian).
12. Maas M., Poll L.W., Terk M.R. Imaging and quantifying skeletal involvement in Gaucher disease. *Br J Radiol*. 2002; 75: 13–24. DOI: 10.1259/bjr.75.suppl_1.750013
13. Lukina E.A., Mamonov V.E., Lukina K.A., et al. Tuberculosis sacroiliitis in patient with Gaucher's disease. *Terapevticheskiy arhiv*. 2013; 7: 87–9 (In Russian).
14. Pastores G.M., Patel M.J., Firooznia H. Bone and joint complications related to Gaucher disease. *Curr Rheumatol Rep*. 2000; 2: 175–80.
15. Lukina K., Yatsyk G., Mamonov V., et al. Radiological assessment of the severity of bone involvement in patients with Gaucher disease. *Poster of Congress ECR*. 2014. DOI: 10.1594/ecr2014/C-2383

Information about the authors

Anastasia A. Solovyeva*, Postgraduate researcher, Radiologist, Department of Magnetic Resonance Imaging and Ultrasound Diagnostics, National Research Center for Hematology, e-mail: solov136@mail.ru, tel.: +7 (915)-488-94-18; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5112-3594>

Galina A. Yatsyk, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Magnetic Resonance Imaging and Ultrasound Diagnostics, National Research Center for Hematology, e-mail: galina.yatsyk@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8589-6122>

Rodion V. Ponomarev, Postgraduate researcher, Hematologist, Department of Orphan Diseases, National Research Center for Hematology, e-mail: ponomarev.r.v@icloud.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1218-0796>

Kira A. Lukina, Cand. Sci. (Med.), Hematologist, Department of Orphan Diseases, National Research Center for Hematology, e-mail: kira1404@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6757-985X>

Костина Ирина Эдуардовна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением рентгенологии и компьютерной томографии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: ikost@list.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4683-4118>

Мамонов Василий Евгеньевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделением ортопедии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: vasily-mamonov@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7795-4564>

Лукина Елена Алексеевна, профессор, доктор медицинских наук, заведующая отделением орфанных заболеваний ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: elenalukina02@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8774-850X>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила 01.11.2018

Принята к печати 24.12.2018

Irina E. Kostina, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Radiology and Computed Tomography, National Research Center for Hematology,
e-mail: ikost@list.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4683-4118>

Vasily E. Mamonov, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Orthopedics, National Research Center for Hematology,
e-mail: vasily-mamonov@yandex.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7795-4564>

Elena A. Lukina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of Orphan Diseases, National Research Center for Hematology,
e-mail: elenalukina02@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8774-850X>

*** Corresponding author**

Received 01 Nov 2018

Accepted 24 Dec 2018

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИИ ГЕНА ФАКТОРА V (ЛЕЙДЕН) И ГЕНА ПРОТРОМБИНА *G20210A* У ЖЕНЩИН С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЛЕБРАНДА 1-ГО ТИПА

Колосков А. В.^{*}, Чернова Е. В.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191015, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Болезнь Виллебранда — наследственное нарушение свертывающей системы крови, обусловленное волнообразным количественным и/или качественным дефицитом фактора Виллебранда.

Цель: оценить частоту встречаемости фактора V (FV_{Leiden}) и FII *G20210A* у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа.

Материалы и методы. В исследование, проведенное с января 2011 по декабрь 2017 г., включены 136 женщин в возрасте от 18 до 45 лет (среднее $31,7 \pm 0,5$ года). Для выявления геморрагического диатеза использовали опросник. Условия включения в исследование: наличие не менее 3 положительных ответов на вопросы с 1 по 7 или 2 положительных ответа на вопросы с 1 по 7 и не менее 100 баллов по результатам оценки объема менструальной кровопотери, самостоятельным критерием включения являлся результат 180 баллов и более при оценке объема менструальной кровопотери. Обязательным критерием включения в исследование было указание на отсутствие тромбоземболических событий у пробанда и у родственников первой линии. Проводилось исследование ристоцетин-кофакторной активности фактора Виллебранда (vWF:RCo), антигена фактора Виллебранда (vWF:Ag), фактора VIII (FVIII:C), агрегации тромбоцитов индуцированной АДФ, ристомицином и коллагеном, молекулярно-генетическое исследование полиморфизма генов FV_{Leiden} и гена протромбина (*FII G20210A*) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции.

Результаты. У 102 женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа мутаций FV_{Leiden} и FII *G20210A* обнаружено не было. Гетерозиготная мутация FV_{Leiden} выявлена у 12 (8,8 %) женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа (vWF:RCo от 27 до 47 % (среднее $37,3 \pm 0,8$ %), vWF:Ag от 25 до 46 % (среднее $37,5 \pm 0,8$ %), FVIII:C от 29 до 49 % (среднее $44,1 \pm 0,5$ %)). Гомозиготная мутация FV_{Leiden} выявлена у 3 (2,2 %) женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа, vWF:RCo у них составила 40, 43 и 45 %, vWF:Ag — 39, 44 и 42 %, FVIII:C — 47, 45 и 48 %. Гетерозиготная мутация FII *G20210A* выявлена у 19 (13,9 %) женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа (vWF:RCo от 36 до 49 % (среднее $43,0 \pm 0,4$ %), vWF:Ag от 32 до 46 % (среднее $42,2 \pm 0,6$ %), FVIII:C от 30 до 49 % (среднее $45,1 \pm 0,4$ %)).

Заключение. Снижение активности факторов VIII и фактора Виллебранда, уменьшая коагуляционный потенциал свертывающей системы крови, может нивелировать возможные проблемы, связанные с мутацией FV_{Leiden} и FII *G20210A* у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа.

Ключевые слова: болезнь Виллебранда, мутация гена фактора V Лейден, мутация гена протромбина *G20210A*

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Колосков А.В., Чернова Е.В. Распространенность мутации гена фактора V (Лейден) и гена протромбина *G20210A* у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 60–65. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-60-65>

PREVALENCE OF FACTOR V LEIDEN AND PROTHROMBIN *G20210A* IN WOMEN WITH VON WILLEBRAND DISEASE TYPE 1

Koloskov A. V., Chernova E. V.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 191015, St. Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Von Willebrand disease is a hereditary malfunction of the blood coagulation system caused by waveform quantitative and/or qualitative deficiency of von Willebrand factor (vWF).

Aim. To evaluate the frequency of occurrence of FV_{Leiden} and FII G20210A mutations in female patients with von Willebrand type 1 disease.

Materials and methods. 136 women aged from 18 to 45 years (mean 31.7 ± 0.5 years) were enrolled in a study conducted during the January 2011 – December 2017 period. Questionnaire was used to reveal hemorrhagic diathesis. Inclusion criteria were as follows: no less than 3 positive responses to questions 1–7, or 2 positive responses to questions 1–7 plus no less than 100 points of the evaluated menstrual blood loss. An independent inclusion criterion was 180 points or more in the question concerning menstrual blood loss. A mandatory inclusion criterion was the confirmation of absence of thromboembolic events in a proband and first line relatives. The study included assessment of such parameters as ristocetin-cofactor activity of von Willebrand factor (vWF:RCo), von Willebrand factor antigen (vWF:Ag), factor VIII (FVIII:C), platelet aggregation induced with ADP, ristomycin, collagen, as well as molecular-genetic assay of factor V (FV_{Leiden}) and gene (FII G20210A) polymorphism using allele-specific polymerase chain reaction.

Results. No mutations of FV_{Leiden} and FII G20210A were revealed in 102 women with von Willebrand disease type 1. Heterozygous mutation of FV_{Leiden} was found in 12 (8.8 %) subjects with von Willebrand disease type 1 (vWF:RCo from 27 to 47 % (mean 37.3 ± 0.8 %), vWF:Ag from 25 to 46 % (mean 37.5 ± 0.8 %), FVIII:C from 29 to 49 % (mean 44.1 ± 0.5 %). Homozygous mutation of FV_{Leiden} was identified in 3 (2.2%) women with von Willebrand disease type 1, with vWF:RCo being 40, 43 and 45 %, vWF:Ag – 39, 44 and 42 %, FVIII:C – 47, 45 and 48 %, respectively. Heterozygous mutation FII G20210A was detected in 19 (13.9 %) subjects with von Willebrand disease type 1 (vWF:RCo from 36 to 49 % (mean 43.0 ± 0.4 %), vWF:Ag from 32 to 46 % (mean 42.2 ± 0.6 %), FVIII:C from 30 to 49 % (mean 45.1 ± 0.4 %).

Conclusion. By means of diminishing the coagulation potential of the blood coagulation system, a decrease in the activity of VIII and von Willebrand factors may compensate possible negative effects associated with FV_{Leiden} and FII G20210A gene mutations in female patients with von Willebrand type 1 disease.

Keywords: von Willebrand disease; factor V Leiden mutation; prothrombin G20210A mutation

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Koloskov A.V., Chernova E.V. Prevalence of factor v leiden and prothrombin G20210A in women with von Willebrand disease type 1. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 60–65 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-60-65>

Введение

Болезнь Виллебранда — наиболее распространенное наследственное (аутосомное) нарушение свертывающей системы крови, обусловленное волнообразным

количественным и/или качественным дефицитом фактора Виллебранда — плазменного белка, опосредующего начальную адгезию тромбоцитов в месте по-

вреждения эндотелия сосуда, взаимодействующего с коллагеном сосудистой стенки и стабилизирующего фактор VIII. Истинная частота встречаемости болезни Виллебранда точно неизвестна из-за выраженной полиморфности клинических проявлений заболевания и отсутствия корреляции между выраженностью клинических проявлений и количественными показателями лабораторных исследований. Также отсутствует единый подход к выбору и оценке результатов лабораторных исследований.

Такие показатели, как ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда (vWF:RCo) и антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag), у клинически здоровых лиц варьируют в широком диапазоне от 50 до 240 %, а во время беременности могут увеличиваться более чем в 6 раз. Нет единого мнения о диагностически значимом снижении этих показателей. Ряд авторов [1–3] предлагает в качестве диагностической отсечки снижение показателей vWF:RCo и/или vWF:Ag менее 50 %, в других источниках предлагается ориентироваться на значение этих показателей менее 30 %. Широко обсуждается использование термина «низкое содержание фактора Виллебранда» для лиц с признаками чрезмерной кровоточивости и показателями vWF:RCo и/или vWF:Ag в диапазоне от 30 до 50 % [4].

Распространенность болезни Виллебранда, оцененная по числу больных, наблюдающихся в специализированных центрах (гематологические диспансеры), составляет 0,0023–0,01 % [2]. Распространенность болезни Виллебранда также изучалась на основании скрининга населения для выявления лиц с симптомами чрезмерной кровоточивости, сниженными показателями vWF:RCo и/или vWF:Ag, а также наличия членов семьи с признаками геморрагического диатеза. Популяционный подход выявил, что распространенность болезни Виллебранда составила 0,6–1,3 %, что более чем на два порядка больше, чем значения, которые были получены на основании исследований, выполненных по данным о больных, наблюдающихся в специализированных центрах. С учетом легких (мягких) форм, проявляющихся единичными эпизодами незначительных кровотечений, этот показатель может оказаться еще выше [2].

В последние годы большое внимание уделяется исследованиям полиморфизма гена фактора V G1691A (FV_{Leiden}) и гена протромбина G20210A ($FII G20210A$) с целью стратификации риска тромбоэмболических осложнений и/или репродуктивных проблем у женщин. Мы обратили внимание на больных женщин, у которых была диагностирована болезнь Виллебранда 1-го типа, являющихся одновременно носительницами гетерозиготной мутации FV_{Leiden} или гетерозиготной мутации $FII G20210A$.

В литературе активно обсуждается частота встречаемости различных генетических полиморфизмов, ассоциируемых с тромбофилией, у больных различ-

ными типами болезни Виллебранда и их клиническое значение [3, 5–7].

Целью настоящего исследования являлась оценка частоты встречаемости мутаций FV_{Leiden} и $FII G20210A$ у женщин, больных болезнью Виллебранда 1-го типа.

Материалы и методы

В исследование, проведенное с января 2011 по декабрь 2017 г., были включены 136 женщин в возрасте от 18 до 45 лет (в среднем $31,7 \pm 0,5$ года), у которых был установлен диагноз болезнь Виллебранда 1-го типа, наблюдавшихся в амбулаторном гематологическом центре, специализирующемся на патологии свертывающей системы крови. При включении в исследование все больные подписывали информированное согласие.

Для выявления признаков геморрагического диатеза использовали опросник, разработанный на основании личного и международного опыта клинической оценки признаков чрезмерной кровоточивости [8–10]. В него входили следующие вопросы.

1. Легко ли образуются синяки?
2. Бывают ли сейчас или были ли ранее носовые кровотечения (если да, то в каком возрасте и как часто)?
3. Было ли кровотечение при удалении зубов (если да, то какова длительность кровотечения)?
4. Есть ли кровоточивость десен?
5. Бывает ли кровотечение при бытовых ранениях и царапинах (если да, то какова длительность)?
6. Было ли обильное кровотечение во время первых месячных?
7. Есть ли боль во время овуляции?
8. Оценка объема менструальной кровопотери с использованием описательного метода, учитывающего количество и наполняемость использованных гигиенических прокладок и/или тампонов. За одну полностью пропитанную прокладку начисляли 20 баллов; прокладка, пропитанная частично, — 10 баллов. Полностью пропитанный тампон — 10 баллов; частично пропитанный тампон — 5 баллов. При наличии сгустков крови диаметром более 2,5 см (диаметр современной монеты достоинством 5 рублей) начисляли дополнительно 5 баллов, при наличии протекания крови через прокладку или тампон — дополнительно 40 баллов [11].

Для включения в исследование необходимым условием было наличие не менее трех положительных ответов на вопросы с 1 по 7 или минимум два положительных ответа на вопросы с 1 по 7 и не менее 100 баллов по результатам оценки объема менструальной кровопотери. Самостоятельным критерием включения являлся результат 180 баллов и более при оценке объема менструальной кровопотери.

Для снижения вероятности попадания в исследуемую группу женщин с сочетанной патологией (клинически значимой тромбофилией) обязательным критерием включения в исследование являлось указание на отсутствие тромбоэмболических событий

у пробанда и указание на отсутствие тромбоза глубоких вен и/или тромбоза легочной артерии у родственников первой линии.

У больных, соответствовавших перечисленным критериям, исследовали vWF:RCo, vWF:Ag и фактор VIII (FVIII:C), определяли соотношение vWF:RCo/vWF:Ag [12]. В качестве дополнительных тестов исследовали агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, ристомидином и коллагеном [12, 13].

Исследования vWF:RCo, vWF:Ag и FVIII:C проводили на автоматическом коагулометре Elite PRO (Instrumentation Laboratory, США) с использованием реагентов HemosiIL (Instrumentation Laboratory, США). Исследование агрегации тромбоцитов выполняли по методу Борна с помощью анализатора агрегации тромбоцитов AT-02 (Россия) с использованием агрегирующих агентов АДФ, коллагена и ристомидина.

При выявлении у больных снижения показателей vWF:RC и vWF:Ag менее 50 % и соотношения vWF:RCo/vWF:Ag > 0,7, а также нарушения агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и/или ристомидином и/или коллагеном, в качестве дополнительных критериев, отражающих снижение свертывающего потенциала крови [12, 13], выполняли молекулярно-генетическое исследование полиморфизма генов фактора V (FV_{Leiden}) и гена протромбина ($FII\ G20210A$) методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Результаты

У 102 женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа (vWF:RCo от 25 до 49 % (среднее $38,6 \pm 0,6$ %), vWF:Ag от 24 до 47 % (среднее $37,1 \pm 0,5$ %), FVIII:C от 25 до 50 % (среднее $40,5 \pm 0,6$ %) мутаций FV_{Leiden} и $FII\ G20210A$ обнаружено не было.

Гетерозиготная мутация FV_{Leiden} выявлена у 12 женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа (vWF:RCo от 27 до 47 % (среднее $37,3 \pm 0,8$ %), vWF:Ag от 25 до 46 % (среднее $37,5 \pm 0,8$ %), FVIII:C от 29 до 49 % (среднее $44,1 \pm 0,5$ %), что составляло 8,8 % от исследованной популяции.

Гомозиготная мутация FV_{Leiden} выявлена у 3 женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа (2,2 % от исследованной популяции) (vWF:RCo — 40, 43 и 45 %, vWF:Ag — 39, 44 и 42 %, FVIII:C — 47, 45 и 48 % соответственно).

Гетерозиготная мутация $FII\ G20210A$ выявлена у 19 женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа (vWF:RCo от 36 до 49 % (среднее $43,0 \pm 0,4$ %), vWF:Ag от 32 до 46 % (среднее $42,2 \pm 0,6$ %), FVIII:C от 30 до 49 % (среднее $45,1 \pm 0,4$ %), что составляло 13,9 % от исследованной популяции.

Обсуждение

Как следует из представленных результатов, гетерозиготные мутации FV_{Leiden} и $FII\ G20210A$ оказались от-

носительно частыми находками у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа. Частота встречаемости гетерозиготной мутации FV_{Leiden} у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа составила 8,8 %, а гомозиготной мутации FV_{Leiden} — 2,2 %.

У здоровых людей европеоидной расы распространенность мутации FV_{Leiden} составляет от 2 до 19 % [14–16]. Частота встречаемости мутации FV_{Leiden} у больных с впервые возникшими тромбозами достигает 20 % [15]. Гомозиготная мутация FV_{Leiden} встречается с частотой примерно 0,02 % [17].

Гетерозиготная мутация $FII\ G20210A$ в исследованной нами группе женщин с болезнью Виллебранда 1 типа встречалась с частотой 13,9 %. Частота встречаемости мутации $FII\ G20210A$ в европеоидной популяции составляет от 1 до 5 % [15–19], а у больных с венозными тромбозами от 4 до 18 % [15, 20].

Столь высокая частота встречаемости обсуждаемых полиморфизмов у лиц со склонностью к чрезмерной кровоточивости требует глубокого переосмысления их клинического значения. Активированный протеин С оказывает антикоагулянтное действие путем расщепления фактора Va в наиболее значимых точках специфического протеолиза, переводя фактор Va в неактивную форму. Кроме того, расщепление полноразмерной молекулы фактора V приводит к появлению антикоагулянтной молекулы, выступающей, в свою очередь, в качестве кофактора для активированного протеина С для инактивации фактора VIIIa [17, 21, 22]. Мутация FV_{Leiden} нарушает оба из описанных механизмов, но приоритетное значение имеет уменьшение образования антикоагулянтной молекулы [20]. Одной из важных функций фактора Виллебранда является стабилизация фактора VIII. При болезни Виллебранда 1-го типа показатель FVIII:C часто снижен. В нашем исследовании у женщин с болезнью Виллебранда 1 типа, носительниц гетерозиготной мутации FV_{Leiden} , показатель FVIII:C составлял от 29 до 49 % (среднее $44,1 \pm 0,5$ %), а у трех женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа, носительниц гомозиготной мутации FV_{Leiden} , были зафиксированы показатели FVIII:C в диапазоне от 45 до 48 %. Снижение активности фактора VIII, по нашему мнению, может нивелировать возможные проблемы, связанные с нарушением механизма инактивации фактора VIIIa, реализуемого с участием активированного протеина С и антикоагулянтной молекулы, образующейся в результате специфического протеолиза фактора V.

Протромбин принимает участие в заключительном этапе свертывающего каскада, превращаясь под действием фактора Ха в тромбин. В этом превращении принимают участие фактор Va, ионы кальция и фосфолипидные поверхности тромбоцитов. Синергетическое взаимодействие факторов Ха и Va на поверхности фосфолипидных мембран в присутствии ионов кальция определяется как «протромбиназный комплекс»

[23]. Полиморфизм *FII G20210A* связывают с более высоким уровнем протромбина в плазме [24], чего недостаточно для безусловной реализации тромбофилического потенциала, поскольку снижение показателей vWF:RCo, vWF:Ag и FVIII:C, а также агрегационной способности тромбоцитов, поверхность которых играет значимую роль в протромбиназном комплексе, у женщин с болезнью Виллебранда 1-го типа, снижают общий коагуляционный потенциал свертывающей системы крови.

Таким образом, принимая во внимание возможный тромбофилический потенциал генетических полиморфизмов *FV_{Leiden}* и *FII G20210A*, представляется логичным

Литература

- Laffan M., Brown S.A., Collins P.W., et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 2006; 10(3): 199–217. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2004.00894.x
- Nichols W.L., Hultin M.B., James A.H., et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia*. 2008; 14(2): 171–232. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x
- Keesler D.A., Flood V.H. Current issues in diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2018; 2(1): 34–41. DOI:10.1002/rth2.12064
- Ng C., Motto D.G., Di Paolo J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood*. 2015; 125(13): 2029–37. DOI:10.1182/blood-2014-08-528398
- Franchini M., Veneri D., Poli G., et al. High prevalence of inherited prothrombotic risk factors in 134 consecutive patients with von Willebrand disease. *Am. J. Hematol.* 2006; 81(6): 465–7. DOI: 10.1002/ajh.20623
- Franchini M. Thrombotic complications in von Willebrand disease. *Hematology*. 2006; 11(1): 49–52. DOI:10.1080/10245330500345710
- Ahmad F., Kannan M., Yadav V., et al. Impact of thrombogenic mutations on clinical phenotypes of von Willebrand disease. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2010; 16(3): 281–7. DOI: 10.1177/1076029609351291
- Rydz N., James P.D. The Evolution and Value of Bleeding Assessment Tools. *J. Thromb. Haemost.* 2012; 10(11): 2223–9. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04923.x
- Sadler J.E., Rodeghiero F. Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3(4): 775–7. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01245.x
- Rodeghiero F., Castaman G., Tosetto A., et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3(12): 2619–26. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01663.x
- Lee C.A., Chi C., Pavord S.R., et al. The obstetric and gynaecological management of women with inherited bleeding disorders — review with guidelines produced by a taskforce of UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 2006; 12(4): 301–36. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2006.01314.x
- Зозуля Н.И., Кумскова М.А. Протокол диагностики и лечения болезни Виллебранда. В кн: Савченко В.Г., редактор. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. М.: Национальный медицинский исследовательский центр гематологии; 2018.
- Воробьев А.И., редактор. Руководство по гематологии. М.: Ньюдиамед; 2003.

предположить, что генетически детерминированная функциональная активность фактора Виллебранда может вносить в реализацию итогового фенотипа индивидуума более существенный и, следовательно, клинически более значимый вклад.

Точность высказанных предположений предстоит оценить в дальнейших исследованиях с учетом возможных дополнительных факторов риска, возникающих, например, при использовании для остановки кровотечения концентратов фактора VIII и фактора Виллебранда, а также применив более широкий арсенал методов, оценивающих состояние свертывающей системы крови.

References

- Laffan M., Brown S.A., Collins P.W., et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 2006; 10(3): 199–217. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2004.00894.x
- Nichols W.L., Hultin M.B., James A.H., et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia*. 2008; 14(2): 171–232. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x
- Keesler D.A., Flood V.H. Current issues in diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2018; 2(1): 34–41. DOI:10.1002/rth2.12064
- Ng C., Motto D.G., Di Paolo J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood*. 2015; 125(13): 2029–37. DOI:10.1182/blood-2014-08-528398
- Franchini M., Veneri D., Poli G., et al. High prevalence of inherited prothrombotic risk factors in 134 consecutive patients with von Willebrand disease. *Am. J. Hematol.* 2006; 81(6): 465–7. DOI: 10.1002/ajh.20623
- Franchini M. Thrombotic complications in von Willebrand disease. *Hematology*. 2006; 11(1): 49–52. DOI:10.1080/10245330500345710
- Ahmad F., Kannan M., Yadav V., et al. Impact of thrombogenic mutations on clinical phenotypes of von Willebrand disease. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2010; 16(3): 281–7. DOI: 10.1177/1076029609351291
- Rydz N., James P.D. The Evolution and Value of Bleeding Assessment Tools. *J. Thromb. Haemost.* 2012; 10(11): 2223–9. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04923.x
- Sadler J.E., Rodeghiero F. Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3(4): 775–7. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01245.x
- Rodeghiero F., Castaman G., Tosetto A., et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3(12): 2619–26. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01663.x
- Lee C.A., Chi C., Pavord S.R., et al. The obstetric and gynaecological management of women with inherited bleeding disorders — review with guidelines produced by a taskforce of UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia*. 2006; 12(4): 301–36. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2006.01314.x
- Zozulja N.I., Kumsikova M.A. Protocol for diagnosis and treatment of von Willebrand disease. In: Savchenko V.G., editor. Diagnostic algorithms and protocols for the treatment of diseases of the blood system. Moscow: National Research Center for Hematology; 2018 (In Russian).
- Vorob'ev A.I., editor Guide on hematology. Moscow: Newdiamed; 2003 (In Russian).

14. Rees D.C., Cox M., Clegg J.B. World distribution of factor V Leiden. *Lancet*. 1995; 346 (8983): 1133–4.
15. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоемболических осложнений. *Флебология*. 2015; 9(4-2): 2–52.
16. Ekim M., Ekim H., Yilmaz Y.K. The prevalence of Factor V Leiden, prothrombin G20210A, MTHFR C677T and MTHFR A1298C mutations in healthy Turkish population. *Hippokratia*. 2015; 19(4): 309–13.
17. Van Cott E.M., Khor B., Zehnder J.L. Factor V Leiden. *Am. J. Hematol*. 2016; 91(1):46–9. DOI: 10.1002/ajh.24222
18. Buchanan G.S., Rodgers G.M., Branch D.W. The inherited thrombophilias: genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 2003; 17(3): 397–411.
19. Lijfering W.M., Middeldorp, S., Veeger, N.J.G.M., et al. Risk of recurrent venous thrombosis in homozygous carriers and double heterozygous carriers of factor V Leiden and Prothrombin G20210A. *Circulation*. 2010; 121(15): 1706–12. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906347
20. Miranda-Vilela A.L. Role of Polymorphisms in Factor V (FV Leiden), Prothrombin, Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1), Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Cystathionine β -Synthase (CBS) Genes as Risk Factors for Thrombophilias. *Mini Rev. Med. Chem*. 2012; 12(10): 997–1006.
21. Segers K., Dahlbäck B., Nicolaes G.A. Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. *Thromb. Haemost.* 2007; 98(3): 530–42.
22. Khor B., Van Cott E.M. Laboratory evaluation of hypercoagulability. *Clin. Lab. Med*. 2009; 29(2): 339–66. DOI: 10.1016/j.cll.2009.03.002
23. Butenas S., van't Veer C., Mann K.G. "Normal" thrombin generation. *Blood*. 1999; 94(7): 2169–78.
24. Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H., Bertina R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996; 88(10): 3698–703.

Информация об авторах

Колосков Андрей Викторович*, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой трансфузиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: Andrei.Koloskov@szgmu.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5249-4255>

Чернова Екатерина Владимировна, ассистент кафедры трансфузиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: katerynachernova@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3791-4506>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила 16.05.2018
Принята к печати 24.12.2018

Information about the authors

Andrei V. Koloskov*, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head of the Department of Transfusiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
e-mail: Andrei.Koloskov@szgmu.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5249-4255>

Ekaterina V. Chernova, Assistant, Department of Transfusiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
e-mail: katerynachernova@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3791-4506>

*** Corresponding author**

Received 16 May 2018
Accepted 24 Dec 2018

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Козырева В. С.^{*}, Шилова А. Н., Шкода О. В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630050, Новосибирск, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Иммунологическая и инфекционная безопасность компонентов крови является основным критерием качества трансфузионной терапии. Внедрение методов фильтрации крови способствует разработке методов валидации контроля остаточных лейкоцитов в продуктах крови. Необходим простой в исполнении и надежный метод подсчета остаточных лейкоцитов в продуктах крови.

Целью данного исследования была сравнительная характеристика использования проточного цитометра и гематологического анализатора для контроля содержания остаточных лейкоцитов в плазме крови.

Материалы и методы. В исследовании сравнили два метода подсчета остаточных лейкоцитов в 191 образце донорской плазмы, производимой в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, при помощи проточного цитометра (Navios Beckman Coulter) с использованием коммерческого набора реагентов LeukoSure и гематологического анализатора Sysmex XT-4000i.

Результаты. Все проанализированные образцы плазмы соответствуют требованиям технического регламента. Большая часть образцов имела очень низкие количества остаточных лейкоцитов. Использование проточного цитометра Navios Beckman Coulter позволило определить в 83 % образцах количество лейкоцитов ≤ 15 кл в мкл, использование автоматического гематологического анализатора Sysmex XT-4000i для подсчета остаточных лейкоцитов в данном диапазоне ограничено чувствительностью прибора и отсутствием аттестованных контрольных материалов с низким содержанием лейкоцитов. Результаты текущего исследования показали, что подсчет остаточных лейкоцитов плазмы крови, оцененный с помощью проточного цитометра Navios Beckman Coulter, дает приемлемые результаты, он также наилучшим образом подходит для образцов с минимальным количеством клеток до 15 единиц в мкл.

Заключение. Значительная вариабельность содержания остаточных лейкоцитов в образцах плазмы крови свидетельствует о целесообразности проверки содержания лейкоцитов во всех компонентах крови.

Ключевые слова: компоненты крови, остаточные лейкоциты, проточная цитометрия, контроль качества

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Козырева В.С., Шилова А.Н., Шкода О.В. Использование метода проточной цитометрии для контроля содержания остаточных лейкоцитов в плазме крови. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 66–72. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-66-72>

FLOW CYTOMETRY FOR MEASURING RESIDUAL LEUKOCYTES IN BLOOD PLASMA

Kozyreva V. S.^{*}, Shilova A. N., Shkoda O. S.

E.N. Meshalkin National Medical Research Center, 630055, Novosibirsk, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Immunological and infectious safety of blood components is considered to be a key condition for high-quality transfusion therapy. The progress of blood filtration methods contributes to the development of methods for the validation of residual leukocyte control in blood products.

The aim of the study was to compare the efficiency of flow cytometer with hematology analyzer for counting residual leukocytes in blood products

Methods. In this study, we compared the efficiency of two analytical instruments for counting residual leukocytes in 191 blood plasma samples: a flow cytometer (Navios Beckman Coulter) with a LeukoSure commercial reagent kit and a Sysmex XT-4000i hematology analyzer.

Results. All the samples under investigation met technical regulation requirements. Most of the samples were characterized by a significantly low amount of residual leukocytes, which fact presented a particular scientific interest. The use of a Navios Beckman Coulter flow cytometer and a commercial reagent kit allowed us to detect 15 or lower cells per μL in 83 % of the samples. The use of a Sysmex XT-4000i automatic hematology analyzer for the calculation of residual white blood cells in this range proved to be limited due to the sensitivity of the device and the absence of certified reference materials with a low white blood cell count.

Conclusion. Our results show that a Navios Beckman Coulter flow cytometer with a commercial reagent kit is suitable for measuring residual leukocytes in blood plasma. This instrument is most appropriate for samples with a minimum number of cells. A significant variability of the amount of residual white blood cells in blood plasma confirms the importance of inspecting the content of leukocytes in all blood components.

Keywords: transfusion of blood components; residual leukocytes; flow cytometry; quality control

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Kozyreva V.S., Shilova A.N., Shkoda O.S. Flow cytometry for measuring residual leukocytes in blood plasma. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 66–72 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-66-72>

Введение

Потребление донорской крови и ее компонентов продолжает увеличиваться, что неизбежно ведет к росту посттрансфузионных осложнений. Развитие высокотехнологичной медицинской помощи обуславливает повышение требований к качеству компонентов крови. Предупреждение большинства нежелательных трансфузионных последствий заключается в повышении качества трансфузионных сред [1]. Иммунологическая и инфекционная безопасность компонентов крови является основным критерием качества трансфузионной

терапии. Лейкоциты, их фрагменты и продуцируемые ими цитокины обуславливают посттрансфузионные осложнения. Переливание реципиенту свободных от лейкоцитов продуктов крови предотвращает НЛА-аллоиммунизацию, фебрильную посттрансфузионную реакцию, реакцию «трансплантат против хозяина», острое трансфузионное поражение легких, передачу цитомегаловирусной инфекции, вируса Эпштейна — Барр, вируса Т-клеточного лейкоза человека, резко снижает вероятность передачи гепатотропных виру-

сов, иммуномодуляцию и передачу прионов (возбудителя болезни Крейтцфельда — Якоба) [2].

В соответствии с техническим регламентом, утвержденным постановлением правительства от 26 января 2010 года № 29 [3], определены приемлемые характеристики качества различных трансфузионных сред: в эритроцитсодержащих компонентах, полученных методом афереза, должно содержаться не более 1×10^6 лейкоцитов в одной дозе, для концентрата тромбоцитов — не более $0,05 \times 10^9$ лейкоцитов в одной дозе, для плазмы — не более $0,1 \times 10^9$ лейкоцитов в литре. В соответствии с требованиями Совета Европы [4] компонент крови для трансфузии после удаления лейкоцитов должен содержать менее 1×10^6 клеток для профилактики посттрансфузионных реакций, обусловленных «остаточными лейкоцитами» [5]. Фильтрация компонентов крови необходима, что, в свою очередь, стимулирует разработку методов валидации контроля остаточных лейкоцитов. Согласно требованиям стандарта качества [5], концентрации лейкоцитов должны находиться в области значений, которые могут быть определены только на приборах с высокой разрешающей способностью. Гемоцитометрия Nageotte была первым практическим методом для подсчета остаточных клеток в компонентах крови и считалась подходящей для рутинного контроля качества [6–8]. Описанный в 1990-х годах данный способ определения с использованием метода световой микроскопии и гемоцитометра большого объема (счетной камеры Nageotte) не позволяет провести экспертную оценку качества фильтрации в силу недостаточной чувствительности метода и характеризуется высокой вариабельностью получаемых результатов [6–8]. Метод Nageotte слишком трудоемкий и неуместен в качестве метода выбора, когда нужно тестировать большое количество образцов [9].

Для преодоления этих трудностей были разработаны альтернативные методы подсчета: автоматизированный объемный капиллярный цитометр [10], проточные цитометрические методы [11, 12] и методы полимеразной цепной реакции [13]. В нескольких исследованиях [10, 14, 15] сравнили количество лейкоцитов, подсчитанных автоматическими методами, с результатами подсчета лейкоцитов, полученными с помощью гемоцитометрии Nageotte. Использование многократных разбавлений показало, что точность гемоцитометра Nageotte была низкой при малых концентрациях остаточных клеток, а результаты были ниже по сравнению с результатами, полученными с помощью автоматизированных методов [6, 16]. Большое количество исследований посвящено сравнению гемоцитометрии Nageotte с различными автоматизированными методами подсчета, основанными на технологии проточной цитометрии [17]. Использование гематологических анализаторов для подсчета остаточных лейкоцитов крайне ограничено в связи с недостаточной

чувствительностью анализа и отсутствием контрольных материалов. А.И. Костин и соавт. [1] отмечают при подсчете лейкоцитов в эритроцитсодержащих компонентах сходство результатов подсчета лейкоцитов до фильтрации обоими методами и допускают возможность использования обычного гематологического анализатора, прошедшего процедуру валидации, при необходимости определения количества лейкоцитов в эритроцитсодержащих компонентах, не подвергавшихся лейкоредукции. Авторы [1] отмечают, что количество остаточных лейкоцитов было выше рекомендованного экспертами Совета Европы [4].

Целью данного исследования была сравнительная характеристика использования проточного цитометра и гематологического анализатора для контроля содержания остаточных лейкоцитов в плазме крови.

Материалы и методы

В качестве анализируемой трансфузионной среды была выбрана плазма крови. Выбор плазмы крови в качестве анализируемой трансфузионной среды был обусловлен тем, что плазма крови — один из самых широко востребованных компонентов крови, при этом стандарты качества в отношении «остаточных лейкоцитов» для плазмы стали применяться относительно недавно по сравнению с эритроцитсодержащими компонентами крови и концентратами тромбоцитов [18].

Для исследования использован 191 образец донорской плазмы крови, произведенный в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, г. Новосибирск.

Для подсчета «остаточных лейкоцитов» в плазме крови на проточном цитометре Navios Beckman Coulter (США) использовали набор реагентов Beckman Coulter LeukoSure (США). Образец плазмы крови лизировали и проводили через процедуру повышения проницаемости мембран с использованием оригинального лизирующего реагента LeukoSure, Beckman Coulter (США). При помощи РНКазы удаляли РНК, и красящий реагент, содержащий йодид пропидия, связывался только с ДНК. Ядросодержащие клетки в образце флуоресцировали с интенсивностью пропорциональной содержанию ДНК. Зрелые эритроциты и тромбоциты, не содержащие ДНК, не связывают краситель. Непосредственно перед анализом добавляли 100 мкл гомогенизированных флуоросфер LeukoSure, осторожно перемешивали, пробирки загружали в карусель для автоматического анализа. Для анализа использовалось фиксированное количество — 10 000 клеток: после того как на проточном цитометре проанализировали 10 000 клеток, протокол измерения останавливали. В регион обнаружения были включены только неповрежденные лейкоциты. При помощи проточного цитометра Navios Beckman Coulter измеряли флуоресценцию каждой помеченной клетки. Так как зрелые тромбоциты и «красные клетки» крови не содержат

ДНК, то помеченные клетки представляли собой лейкоцитарный компонент образца.

Процедура лизиса и окрашивания, настройка проточного цитометра и создание протоколов измерения проходили согласно инструкции производителя к комплекту реагентов. Линейность измерения лейкоцитов, заявленная производителем, определена диапазоном от 0 до 400 клеток в 1 мкл образца. Контроль качества измерений содержания лейкоцитов в плазме крови проводили с использованием двух уровней контрольных материалов, Leuko-Trol Platelet Control Cells Low/High Beckman Coulter в каждой аналитической серии. Контрольные материалы для оценки качества измерения остаточных лейкоцитов соответствовали следующим диапазонам измерений: 0,5–4,5 клетки в 1 мкл и 14,5–25,5 клетки в 1 мкл соответственно.

В этих же образцах плазмы крови содержание лейкоцитов определяли при помощи автоматического гематологического анализатора Sysmex XT-4000i (Япония) согласно стандартному протоколу работы на автоматическом гематологическом анализаторе. В данном гематологическом анализаторе для подсчета количества лейкоцитов используется также принцип флуоресцентной проточной цитометрии. Проба направляется в проточную кювету. Образец подсвечивается лучом полупроводникового лазера, который может разделять клетки посредством трех различных сигналов: прямо рассеянный свет (прямое рассеяние/FSC), боковой рассеянный свет (боковое рассеяние/SSC), боковой флуоресцентный свет (боковая флуоресценция/SFL). Интенсивность прямого рассеяния указывает на объем клетки. Боковое рассеяние предоставляет информацию о содержимом клетки: о ядре и гранулах. Боковая флуоресценция указывает на количество ДНК и РНК в клетке. Клетки со схожими физико-химическими свойствами формируют кластер на графическом изображении, известном как диаграмма рассеивания.

Линейность измерения содержания лейкоцитов в режиме анализа биологической жидкости, заявленная производителем, определена в диапазоне $0,05 \times 10^3$ до $10,000 \times 10^3$ клеток в 1 мкл образца. В связи с тем что нет коммерческих контрольных материалов, разработанных для контроля остаточных лейкоцитов и аттестованных для автоматического гематологического анализатора Sysmex XT-400, контроль качества измерений содержания лейкоцитов в образцах плазмы крови проводили с использованием трех уровней контрольных материалов: Liquechek Hematology Control (X) Levels 1, 2 and 3 Bio-Rad. Контрольные материалы для оценки качества измерения остаточных лейкоцитов соответствовали следующим диапазонам измерений: $(3,0-4,6) \times 10^3$ клеток в 1 мкл, $(6,3-8,3) \times 10^3$ клеток в 1 мкл и $(16,7-20,9) \times 10^3$ клеток в 1 мкл соответственно.

Статистическая обработка результатов произведена с использованием статистических критериев в программе Statistica 6.0. Полученные результаты измерения количества остаточных лейкоцитов методом проточной цитометрии проверены на нормальность распределения при помощи метода Колмогорова — Смирнова. Результаты представлены в виде медианы, межквартильного интервала (25 и 75 % квартили).

Результаты

Количество лейкоцитов в анализируемых образцах плазмы, определенных при помощи проточного цитометра и гематологического анализатора, представлено в таблице 1.

Обращала на себя внимание неоднородность распределения количества остаточных лейкоцитов в различных образцах донорской плазмы (рис. 1). 98,95 % анализируемых образцов донорской плазмы имели количество остаточных лейкоцитов менее 100 кл/мкл. 2 образца донорской плазмы содержали лейкоциты 140 и 217 кл/мкл соответственно. Большая часть (83 %) анализируемых образцов плазмы имела количество остаточных лейкоцитов меньше либо равное 15 кл/мкл, из них 20 % имело нулевое содержание остаточных лейкоцитов, определенное методом проточной цитометрии.

Количество лейкоцитов $0,05 \times 10^3$ кл/мкл соответствовало нижней границе линейности измерения анализатора в режиме биологической жидкости. Соответственно результаты измерения количества лейкоцитов, находящиеся ниже предела линейности (85 % образцов), не могли быть оценены достоверно.

При оценке остаточного количества лейкоцитов повышенного внимания заслуживали образцы с малым количеством лейкоцитов, поскольку в связи с повышающимися требованиями к компонентам крови приоритет должен быть отдан использованию образцов с наименьшим содержанием остаточных лейкоцитов.

Имелась значимая корреляция ($r = 0,96718$, $p = 0,95$) между количеством остаточных лейкоцитов, определенных при помощи проточного цитометра, и количеством лейкоцитов, определенных при помощи гематологического анализатора (рис. 2).

Таблица 1. Количество остаточных лейкоцитов в плазме донорской крови, определенное при помощи проточного цитометра и автоматического гематологического анализатора

Table 1. Use of a flow cytometer and a hematology analyzer for counting residual leucocytes in donor plasma

Проточный цитометр, количество лейкоцитов, кл/мкл Flow cytometer, WBC cells/ μ l	Гематологический анализатор, количество лейкоцитов, кл/мкл Hematology analyzer, WBC cells/ μ l
2,000 (1,00;5,00)	10,000 (0,00;10,00)

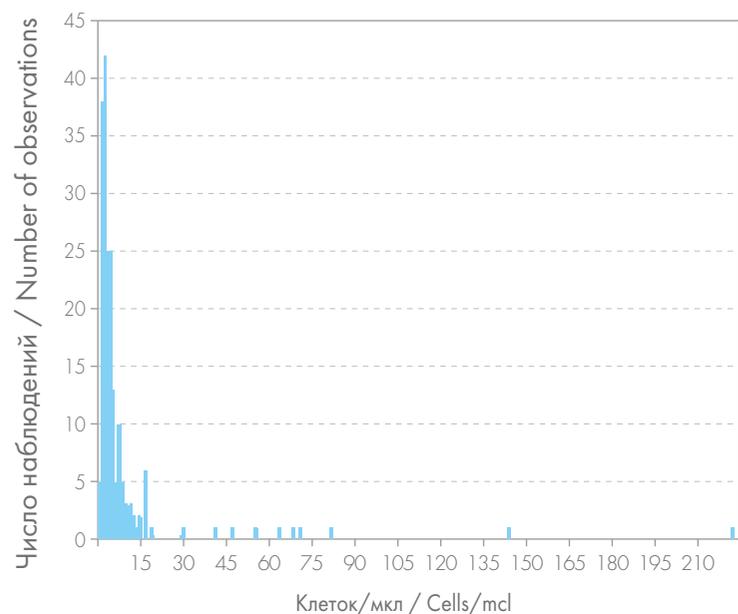


Рисунок 1. Содержание остаточных лейкоцитов в плазме донорской крови, определенное при помощи проточного цитометра

Figure 1. Residual leucocytes content in donor plasma determined by a flow cytometer

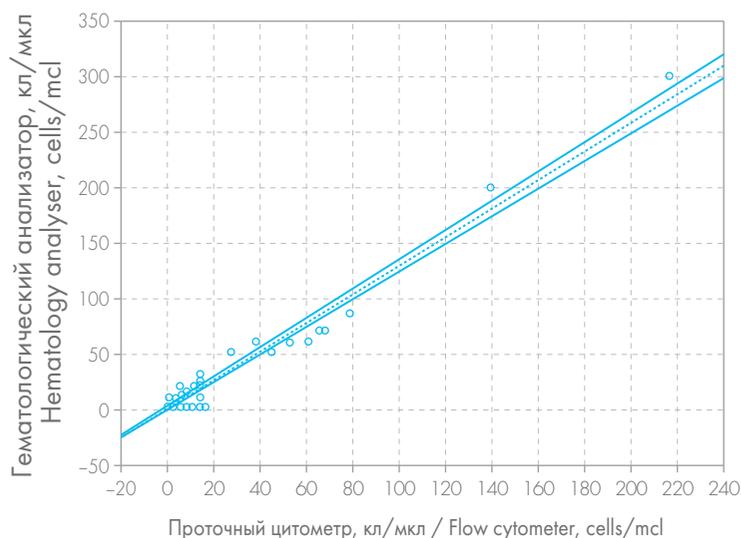


Рисунок 2. Корреляция значений количества лейкоцитов, измеренных при помощи проточного цитометра и гематологического анализатора ($r = 0,96718$, $p = 0,95$)

Figure 2. Correlation between WBC estimated by a flow cytometer and a hematology analyser ($r = 0,96718$, $p = 0,95$)

Обсуждение

Развитие технологий афереза позволяет производить плазму, практически не содержащую клеток крови, что, в свою очередь, требует наличия простого, объективного и точного метода подсчета остаточных клеток крови. В данном исследовании сравнили использование автоматического гематологического анализатора Sysmex XT-4000i и проточной цитометрии (Navios) с коммерческим набором для подсчета остаточных лейкоцитов в плазме крови. В отсутствие метода «золотого стандарта», учитывая, что не проводили эксперименты по разбавлению, основной целью было выяснить соответствие между этими методами

и преимущества использования в реальных условиях работы лаборатории.

Обнаружена сильная корреляция значений количества лейкоцитов, измеренных при помощи проточного цитометра Navios и гематологического анализатора Sysmex XT-400 ($r = 0,96718$, $p = 0,95$), что свидетельствует о хорошей сопоставимости методов и, вероятно, возможной взаимозаменяемости в условиях работы лаборатории.

Согласно анализу на гематологическом анализаторе, все компоненты донорской плазмы соответствовали техническому регламенту, но пороговые значения прибора не позволяли точно оценить низкие значения концентраций клеток после лейкоредукции.

Лейкоциты в плазме крови способны к активации во время хранения и секреции цитокинов и факторов роста, что, в свою очередь, может вызвать трансфузионные реакции у реципиента [19, 20]. Относительно большое количество остаточных лейкоцитов (до 100 кл в мкл) допускается согласно техническому регламенту [3], но адаптации Европейского совета [4] рекомендуют использовать продукты плазмы с наименьшим возможным содержанием остаточных клеток. С учетом того, что отдается предпочтение использованию образцов с минимальным содержанием остаточных клеток, предпочтительнее использовать проточную цитометрию с коммерческим набором реагентов для подсчета остаточных лейкоцитов в продуктах крови. Кроме того, наличие аттестованных контрольных материалов с диапазонами значений низких концентраций лейкоцитов свидетельствует в пользу выбора метода проточной цитометрии для рутинной оценки количества остаточных клеток в продуктах крови, так как позволяет сделать выводы о воспроизводимости и правильности проводимых измерений. К недостаткам данного метода можно отнести высокую стоимость по сравнению с использованием гематологического анализатора и наличие технической подготовки оператора прибора при настраивании протоколов. Оба метода не являются трудоемкими и могут использоваться для большого потока исследований.

Таким образом, для полноценного удаления лейкоцитов из трансфузионных сред с целью снижения риска трансфузионных осложнений необходим правильный контроль качества компонентов крови в отношении количества остаточных лейкоцитов. Результаты настоящего исследования показали, что подсчет остаточных лейкоцитов плазмы крови для проверки на соответствие техническому регламенту возможен как при использовании технологии проточной цитометрии, так и при использовании автоматического гематологического анализатора. Применение метода проточной цитометрии позволяет с высокой точностью производить подсчет остаточных лейкоцитов в компонентах крови за счет улавливания наименьших значений. Использование проточного цитометра

с коммерческим анализом набора лучше подходит для образцов с минимальным количеством клеток до 15 клеток в мкл по сравнению с использованием гематологического анализатора.

Литература

1. Костин А.И., Майорова О.А., Ложкин А.В. и др. К вопросу о контроле качества эритроцитсодержащих компонентов крови, обедненных лейкоцитами. *Трансфузиология*. 2011; 12(2): 12–33.
2. Максимов В.А. Инфекционная безопасность донорской крови и ее компонентов. Санэпидемконтроль. Охрана труда. 2009; 3.
3. Постановление Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии» (с изменениями и дополнениями).
4. Council of Europe Publishing. Strasbourg, France. Guide to the preparation use and quality assurance of blood components, 7th edition. 2001. 127–32.
5. Зарубин М.В., Саратов О.Е., Веревкина Л.Н., Жибурт Е.Б. Стратификация плазмы по содержанию лейкоцитов. *Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины*. 2015; 1: 67–70.
6. Dzik S., Moroff G., Dumont L. A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte haemocytometry, flow cytometry, and microfluorimetry. *Transfusion*. 2000; 40: 513–20.
7. Van Der Meer P.F., Gratama J.W., Van Delden C.J., et al. Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leucoreduced blood components. *Br J Haematol*. 2001; 115: 953–62.
8. Dzik W.H., Ragosta A., Cusack W.F. Flow-cytometric method for counting very low numbers of leukocytes in platelet products. *Vox Sang*. 1990; 59: 153–9.
9. Palmer D.S., Birch P., O’Toole J., et al. Flow cytometric determination of residual white blood cell levels in preserved samples from leukoreduced blood products. *Transfusion*. 2008; 48(1): 118–28.
10. Adams M.R., Johnson D.K., Busch M.P., et al. Automated volumetric capillary cytometry for counting white cells in white cell-reduced plateletpheresis components. *Transfusion*. 1997; 37: 29–37.
11. Wenz B., Burns E.R., Lee V., Miller W.K. A rare-event analysis model for quantifying white cells in white cell-depleted blood. *Transfusion*. 1991; 31: 156–9.
12. Barclay R., Walker B., Allan R., et al. Flow cytometric determination of residual leucocytes in filter-depleted blood products: an evaluation of Becton-Dickinson’s Leuco COUNT system. *Transfus Sci*. 1998; 19: 399–403.
13. Lee T.H., Stromberg R.R., Heitman J., et al. Quantification of residual white cells in filtered blood components by polymerase chain reaction amplification of HLA DQ-A DNA. *Transfusion* 1994; 34: 986–94.
14. Dumont L.J., Dumont D.F. Enhanced flow cytometric method for counting very low numbers of white cells in platelet products. *Cytometry*. 1996; 26: 311–6.
15. Dzik W.H., Rebull P. Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leukocyte-depleted red blood cells. *Vox Sang*. 1994; 66: 25–32.
16. van der Meer P.F., Gratama J.W., van Delden C.J., et al. Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leucoreduced blood components. *Br. J. Haematol*. 2001; 115: 953–62.
17. Kyriakou E., Nearchakos N., Bonovas S. Comparison between Nageotte and flow cytometric counting of residual leucocytes in freshly prepared leucocyte-reduced red blood cell components. *Transfus Apher Sci*. 2018. DOI: 10.1016/j.transci.2018.06.002 [Epub ahead of print]
18. Masse M. Universal leukoreduction of cellular and plasma components: process control and performance of the leukoreduction process. *Tranfus Clin Biol*.

Значительная вариабельность содержания остаточных лейкоцитов в образцах плазмы крови свидетельствует о целесообразности проверки содержания лейкоцитов во всех компонентах крови.

References

1. Kostin A.I., Mayorova O.A., Lozhkin A.V., Pochtar’ M.E., Demicheva M.I., Kuzmichev V.A. On the issue of quality control of erythrocyte-containing blood components depleted of leukocytes. *Transfuziologiya*. 2011; 12(2): 12–33 (In Russian).
2. Maksimov V.A. Infectious safety of donor blood and its components. *Sanepidemkontrol’. Ohrana truda*. 2009; 3 (In Russian).
3. Resolution of the Government of the Russian Federation of January 26, 2010 No 29 “On approval of technical regulations on safety requirements for blood, its products, blood-substituting solutions and technical means used in transfusion-infusion therapy” (In Russian).
4. Council of Europe Publishing. Strasbourg, France. Guide to the preparation use and quality assurance of blood components, 7th edition. 2001; 127–32.
5. Zarubin M.V., Saratova O.E., Verevkin L.N., Zhiburt E.B. Stratification of plasma by the content of leukocytes. *Topical issues of transfusiology and clinical medicine*. 2015; 1: 67–70 (In Russian).
6. Dzik S., Moroff G., Dumont L. A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte haemocytometry, flow cytometry, and microfluorimetry. *Transfusion*. 2000; 40: 513–20.
7. Van Der Meer P.F., Gratama J.W., Van Delden C.J., et al. Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leucoreduced blood components. *Br J Haematol*. 2001; 115: 953–62.
8. Dzik W.H., Ragosta A., Cusack W.F. Flow-cytometric method for counting very low numbers of leukocytes in platelet products. *Vox Sang*. 1990; 59: 153–9.
9. Palmer D.S., Birch P., O’Toole J., et al. Flow cytometric determination of residual white blood cell levels in preserved samples from leukoreduced blood products. *Transfusion*. 2008; 48(1): 118–28.
10. Adams M.R., Johnson D.K., Busch M.P., et al. Automated volumetric capillary cytometry for counting white cells in white cell-reduced plateletpheresis components. *Transfusion*. 1997; 37: 29–37.
11. Wenz B., Burns E.R., Lee V., Miller W.K. A rare-event analysis model for quantifying white cells in white cell-depleted blood. *Transfusion*. 1991; 31: 156–9.
12. Barclay R., Walker B., Allan R., et al. Flow cytometric determination of residual leucocytes in filter-depleted blood products: an evaluation of Becton-Dickinson’s Leuco COUNT system. *Transfus Sci*. 1998; 19: 399–403.
13. Lee T.H., Stromberg R.R., Heitman J., et al. Quantification of residual white cells in filtered blood components by polymerase chain reaction amplification of HLA DQ-A DNA. *Transfusion* 1994; 34: 986–94.
14. Dumont L.J., Dumont D.F. Enhanced flow cytometric method for counting very low numbers of white cells in platelet products. *Cytometry*. 1996; 26: 311–6.
15. Dzik W.H., Rebull P. Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leukocyte-depleted red blood cells. *Vox Sang*. 1994; 66: 25–32.
16. van der Meer P.F., Gratama J.W., van Delden C.J., et al. Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leucoreduced blood components. *Br. J. Haematol*. 2001; 115: 953–62.
17. Kyriakou E., Nearchakos N., Bonovas S. Comparison between Nageotte and flow cytometric counting of residual leucocytes in freshly prepared leucocyte-reduced red blood cell components. *Transfus Apher Sci*. 2018. DOI: 10.1016/j.transci.2018.06.002 [Epub ahead of print]
18. Masse M. Universal leukoreduction of cellular and plasma components: process control and performance of the leukoreduction process. *Tranfus Clin Biol*.

2001; 8: 297–302.

19. Muylle L. The role of cytokines in blood transfusion reactions. *Blood Rev.* 1995; 9: 77–83.

20. Sedlmayr P., Blaschitz A., Wilders-Truschnig M., et al. Platelets contain interleukin-1 alpha and beta which are detectable on the cell surface after activation. *Scand J Immunol.* 1995; 42: 209–14.

Информация об авторах

Козырева Виктория Сергеевна*, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

e-mail: vs_kozyreva@meshalkin.ru, тел.: +7 (913)757-64-03;

630050, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2860-7704>

Шилова Анна Николаевна, доктор медицинских наук, заведующий отделением лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4263-7774>

Шкода Ольга Сергеевна, врач КЛД лаборатории клинической иммунологии отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4226-0172>

* Автор, ответственный за переписку

Поступила 16.05.2018

Принята к печати 24.12.2018

2001; 8: 297–302.

19. Muylle L. The role of cytokines in blood transfusion reactions. *Blood Rev.* 1995; 9: 77–83.

20. Sedlmayr P., Blaschitz A., Wilders-Truschnig M., et al. Platelets contain interleukin-1 alpha and beta which are detectable on the cell surface after activation. *Scand J Immunol.* 1995; 42: 209–14.

Information about the authors

Victoria S. Kozyreva*, Medical Laboratory Scientist, Laboratory of Clinical Immunology, Department of Laboratory Diagnostics, E.N. Meshalkin National Medical Research Center,

e-mail: vs_kozyreva@meshalkin.ru, tel.: +7 (913)757-64-03;

630050, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2860-7704>

Anna N. Shilova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Laboratory Diagnostics, E.N. Meshalkin National Medical Research Center,

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4263-7774>

Olga S. Shkoda, Medical Laboratory Scientist, Department of Laboratory Diagnostics, E.N. Meshalkin National Medical Research Center,

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4226-0172>

* Corresponding author

Received 16 May 2018

Accepted 24 Dec 2018

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-73-78>

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОГО КОНЦЕНТРАТА ФИБРИНОГЕНА

Хурдин В. В.^{1*}, Берковский А. Л.², Сергеева Е. В.², Суворов А. В.²

¹ ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», 119571, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель работы — разработать метод получения концентрата фибриногена, свободного от балластных белков, для производства гемостатического препарата на основе фармацевтической субстанции фибриногена.

Материалы и методы. Метод основан на выделении фибриногена из раствора криопреципитата осаждением раствором полиэтиленгликоля с последующей вирусной инактивацией сольвент/детергентом. Очистку от продуктов вирусной инактивации и балластных белков проводили путем двухступенчатой обработки полученного концентрата фибриногена раствором глицина.

Результаты. Разработанная лабораторная методика выделения фибриногена была оптимизирована по основным параметрам и масштабирована в условиях опытного производства.

Заключение. Разработанная лабораторная методика выделения фибриногена характеризуется высоким выходом целевого продукта и может применяться при производстве гемостатического препарата.

Ключевые слова: фибриноген, препараты крови, фибриновый клей, фракционирование плазмы, гипофибриногенемия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Хурдин В.В., Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В. Получение очищенного концентрата фибриногена. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 73–78. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-73-78>

PRODUCTION OF PURIFIED FIBRINOGEN CONCENTRATE

Khurdin V. V.^{1*}, Berkovskiy A. L.², Sergeeva E. V.², Suvorov A. V.²

¹ MIREA-Russian Technological University, 119571, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To present a technique for obtaining fibrinogen concentrate purified from ballast proteins, which can be used in hemostatic drug production.

Materials and methods. The proposed method is based on isolating fibrinogen from a cryoprecipitate solution by its precipitation with a polyethylene glycol solution followed by virus inactivation by a solvent/detergent. Purification from viral

inactivation products and ballast proteins is performed by a two-step processing of the obtained fibrinogen concentrate with glycine solution.

Results. The developed laboratory method for isolating fibrinogen has been optimized in terms of main parameters and scaled in pilot production.

Conclusion. The presented laboratory technique for fibrinogen extraction is characterized by a high yield of the target product, thus being suitable for the production of hemostatic drugs.

Keywords: fibrinogen, blood drugs, fibrin glue, plasma fractionation, hypofibrinogenemia

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Khurdin V.V., Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V. Production of purified fibrinogen concentrate. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 73–78 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-73-78>

Введение

На протяжении многих лет хирургия нуждалась в гемостатических препаратах, которые могли бы остановить кровотечение при минимальной инвазивности вмешательства и изменениях соединяемых тканей и улучшить процесс регенерации за счет биологического сродства используемых материалов. Использование биологических адгезивных средств в качестве гемостатических препаратов открывает возможности в хирургической практике. Таким биологическим адгезивом может являться фибриновый клей, компоненты которого выделяются из плазмы крови человека.

Фибриноген (фактор свертывания I) представляет собой белок плазмы крови, растворимый гликопротеин — комплекс трех пар полипептидных (α , β и γ) цепей [1], который под действием тромбина (фактора свертывания IIa) преобразуется в фибрин — нерастворимый биополимер, сеть волокон которого является основой кровяного сгустка, обеспечивающего гемостаз. Наряду с обеспечением гемостаза фибриноген участвует в заживлении ран, развитии опухолей и в метастазировании [2]. Недостаточность фибриногена проявляется нарушением гемостаза и приводит к кровотечениям. Дефицит фибриногена может быть как врожденным, так и приобретенным. Наиболее распространенным является приобретенный дефицит в результате гемолизу, кровопотери и диссеминированного внутрисосудистого свертывания [3]. Основным методом лечения и профилактики гипофибриногенемии является заместительная терапия препаратами и компонентами крови, содержащими фибриноген [4].

Добавление тромбина к раствору фибриногена инициирует процесс перехода растворимого фибриногена в фибрин с образованием плотного, вязкоэластичного, клейкого сгустка. Механизм, посредством которого мономеры фибрина полимеризуются с образованием решетчатой трехмерной структуры, был объектом множества исследований. Наличие катионов Ca^{2+} и Zn^{2+} уменьшает время образования сгустка и увеличивает как его вязкоэластичность, так и плотность [5]. Трансформация растворимого фибриногена в сгусток разделена на ряд последовательных этапов, а именно:

образование фибрин-мономеров, их полимеризация с формированием линейных протофибрилл и образование нерастворимого трехмерного геля (коагуляция, гелеобразование). Фактор XIIIa вызывает полимеризацию и образование поперечных сшивок между фибрином и фибронектином, а также другими адгезивными белками, усиливая взаимодействие фибрина с тромбоцитами и сосудистой стенкой, что обеспечивает повышение гемостатических свойств фибрина. Благодаря действию фактора XIIIa аналогичным образом вовлекается в сгусток α_2 -антиплазмин и тем самым увеличивается его резистентность к плазмину [5].

В настоящее время существуют несколько методов выделения фибриногена. К ним относятся спирто-холодовое осаждение [6], высаливание и обработка раствора, содержащего фибриноген, хлоридом аммония [7]. Все эти способы характеризуются низким выходом целевого продукта и делают процесс выделения трудоемким за счет приготовления сложных буферных растворов и необходимости их последующего отмывания. Длительность этих процедур приводит к значительным потерям продукта в ходе получения. Более того, часто используемая стадия термической пастеризации раствора фибриногена с целью инактивации вирусов и других патогенов приводит к частичной полимеризации в конечном продукте, что, в свою очередь, сказывается на конечной концентрации фибриногена.

Целью данной работы является разработка способа получения лиофилизованной формы вирус-безопасного высокоочищенного концентрата фибриногена с оптимизацией технологических условий процесса выделения, который может конкурировать с существующими в настоящее время методами выделения по чистоте конечного продукта.

Материалы и методы

В качестве исходного сырья использовали свежемороженную плазму (СЗП) человека, полученную в отделении заготовки крови и ее компонентов (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва) согласно «Инструкции по проведению донорского

прерывистого плазмафереза», утвержденной Минздравом России 23.09.2002 [8]. Аттестацию СЗП проводили в соответствии с техническим регламентом «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 года № 29 [9].

Концентрацию фибриногена (г/л) измеряли коагулологическим методом на анализаторе MC 4 PLUS (Merlin Medical, Германия). Для проведения коагулологических измерений использовали плазму-калибратор, аттестованную по содержанию фибриногена, и высокоактивный тромбин. Для разведения исследуемых образцов использовали имидазоловый буфер. Контроль построения калибровочных прямых осуществляли с помощью контрольной плазмы (плазма крови человека с нормальными и патологическими параметрами системы гемостаза). Использовали реагенты производства МБООИ «Общество больных гемофилией» (Россия).

Содержание фибриногена в процессе выделения и получения концентрата определяли, смешивая в кювете коагулометра по 100 мкл исследуемого раствора фибриногена и 50 мкл тромбина с активностью 50 МЕ/мл. Измеряли время от момента добавления тромбина до момента образования сгустка. Содержание фибриногена определяли по калибровочному графику, построенному заранее с использованием последовательных разведений вторичного стандарта фибриногена (плазма-калибратор) с известной концентрацией фибриногена.

Концентрацию общего белка определяли методом Бредфорда на спектрофотометре Ultrospec 2100 pro (GE HealthCare, США). В качестве калибратора использовали раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 60 г/л (ООО «Агат-Мед», Россия). Молекулярно-массовое распределение в полученных образцах концентрата фибриногена изучали методом SDS-электрофореза на полиакриламидном геле в градиенте 4–15 %. Использовали систему для электрофореза Fast System (GE HealthCare, США).

Результаты

Основным сырьем для получения фибриногена явился криопреципитат (КП), полученный из СЗП человека. В качестве метода получения КП использовали криофракционирование. Для этого СЗП подвергали медленному размораживанию при 0–2 °С для того, чтобы большая часть криоглобулиновых белков оста-

лась в осадке, который затем отделяли центрифугированием. Содержание фибриногена в КП составляло ~90 % от общего белка. Полученный КП растворяли в трехкратном объеме дистиллированной воды в присутствии нефракционированного гепарина (2 МЕ/мл). После растворения КП его обрабатывали 3 % гелем гидроксида алюминия при интенсивном перемешивании. Сорбирующий гель отделяли от раствора центрифугированием, а полученный супернатант обрабатывали полиэтиленгликолем (ПЭГ)-4000. Активность факторов протромбинового комплекса после сорбции значительно уменьшилась и составила не более 0,04 МЕ/мл (контроль активности вели по фактору II). Фибриноген из раствора выделяли, осаждая его ПЭГ-4000 при интенсивном перемешивании. рН раствора при этом доводили до величины, близкой к изоэлектрической точке фибриногена (6,6–6,8), 0,5 М раствором уксусной кислоты. Полученный супернатант передавали на производство очищенного фактора VIII, а преципитат использовали далее для получения концентрата фибриногена.

Содержащую фибриноген пасту растворяли при интенсивном перемешивании в десятикратном объеме буфера, содержащего 10 мМ трехзамещенного цитрата натрия и 0,15 М хлорида натрия. рН корректировали 0,5 М раствором трис-основания до уровня 7,8–8,0. После растворения пасты раствор центрифугировали для осветления. Процесс растворения фибриногена зависел от температуры: концентрация фибриногена в растворе возрастала с 25 до 38 г/л при увеличении температуры растворения с 20 до 37 °С.

С целью обеспечения вирусной безопасности концентрата фибриногена была проведена сольвент/детергентная вирусная инактивация раствора, содержащего фибриноген. В качестве агентов вирусной инактивации были выбраны 1 % раствор Tween-80 (моноолеат полиоксиэтиленсорбитан) и 0,3 % ТnBP (три-н-бутилфосфат) [10]. Раствор, содержащий фибриноген, инкубировали при комнатной температуре при непрерывном перемешивании в течение 6–10 часов. Для очистки концентрата фибриногена от продуктов вирусной инактивации и инактивирующих агентов полученный раствор подвергали процедуре 3-кратной экстракции вазелиновым маслом при интенсивном перемешивании в течение 2 часов. Затем супернатант, содержащий фибриноген, центрифугировали и отделяли водный слой, содержащий раствор фибриногена. Отделение фибриногена от балластных белков проводили

Таблица 1. Влияние температуры на концентрацию фибриногена при растворении фибриноген-содержащей пасты
Table 1. Effect of temperature on the fibrinogen concentration during the process of fibrinogen-containing paste dissolution

Температура растворения, °С Dissolution temperature, °C	37	30	20
Концентрация фибриногена в растворе, г/л Fibrinogen concentration in solution, g/l	37–39	34–36	24–26

методом переосаждения. В раствор при интенсивном перемешивании добавляли глицин. При этом образовывался осадок фибриногена, который затем отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в буфере, содержащем 10 мМ трехзамещенный цитрат натрия и 0,15 М хлорид натрия. Процедуру осаждения проводили дважды, каждый раз отмывая осадок холодным раствором глицина. При добавлении глицина по мере его растворения наблюдалось образование белкового осадка. После его отделения центрифугированием были взяты пробы надосадочной жидкости, в которой определяли концентрацию фибриногена (табл. 2).

При добавлении глицина до концентрации в растворе, равной 1 М, к концентрату фибриногена при интенсивном перемешивании наблюдалось мгновенное образование белковых сгустков. После центрифугирования были взяты пробы надосадочной жидкости, при исследовании которых установлено, что в них содержится еще значительное количество (5,81 г/л) неосадившегося фибриногена. Увеличение концентрации глицина в растворе до 1,5 М привело к тому, что в пробах надосадочной жидкости практически полностью перестал определяться растворенный фибриноген. При этом концентрация переосажденного фибриногена составила 20–23 г/л. Увеличение концентрации глицина в растворе до 2,0 и 2,8 М привело к обратному результату: концентрация переосажденного фибриногена в растворе после растворения осадка уменьшалась до 15 и 10 г/л соответственно. В последнем случае количество глицина было настолько высоким, что он не растворялся полностью.

Диапазон значений рН на стадии осаждения был выбран наиболее близким к физиологическим величинам (7,0–7,8). рН корректировали 0,5 М раствором трис-основания. Оптимальным для осаждения глицином являлся рН, равный 7,5 (табл. 3).

Осадок фибриногена растворяли в буфере, содержащем цитрат натрия и хлорид натрия, при рН 7,5–7,8 до концентрации 20–25 г/л и подвергали стерилизующей фильтрации. Стерилизующую фильтрацию и розлив проводили в зоне с ламинарным воздушным потоком, соответствующей по чистоте классу А. Все емкости и оборудование (флаконы, пробки, колпачки, фильтр) после стерилизации поступали в «чистую зону». Фильтрацию осуществляли через стерилизующий фильтр Millipac с диаметром пор 0,22 мкм. Далее весь объем жидкости разливали по 2 мл во флаконы. Флаконы закрывали стерильными пробками и далее передавали на стадию лиофильной сушки. После розлива флаконы с препаратом помещали в поддоны лиофилизатора. Программу лиофилизации и термической инактивации задавали с помощью компьютера. Процесс состоял из трех стадий:

- 1) заморозка раствора при температуре –50 °С и давлении 1 бар в течение 7,5 ч;
- 2) лиофилизация при температуре от –20 до +30 °С и давлении 60 мкбар в течение 40,5 ч;
- 3) термическая вирусная инактивация при температуре 60 °С и давлении 60 мкбар в течение 72 ч.

Полученный лиофилизат укупоривали под вакуумом, флаконы обжимали алюминиевыми колпачками. Для дальнейшего исследования полученного концентрата фибриногена флаконы вскрывали, растворяли концентрат до жидкого состояния дистиллированной водой с помощью легкого покачивания, затем

Таблица 2. Влияние концентрации глицина на растворимость фибриногена при избавлении концентрата фибриногена от балластных белков
Table 2. Effect of glycine concentration on the fibrinogen solubility during purification of the fibrinogen concentrate from ballast proteins

Концентрация глицина, М Glycine concentration, M	1		1,5		2		2,8	
	Надосадочная жидкость Supernatant	Переосажденный фибриноген Precipitated fibrinogen						
Образец Sample								
Концентрация фибриногена в растворе, г/л Fibrinogen concentration in solution, g/l	5–7	8–10	0–0,2	20–23	0–0,5	13–16	0	7–9,5

Таблица 3. Влияние рН на концентрацию фибриногена при растворении преципитата фибриногена
Table 3. Effect of pH on the fibrinogen concentration during the process of precipitated fibrinogen dissolution

рН	7,00	7,50	8,00
Концентрация фибриногена в растворе, г/л Fibrinogen concentration in solution, g/l	30–31	34–36	30–32

выдерживали при комнатной температуре до полного растворения в течение 15 минут.

Чтобы охарактеризовать полученный концентрат фибриногена по количеству действующего вещества и наличию примесей, был проведен электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях на системе Phast System Pharmacia (рис. 1).

На рисунке 1 представлена пластина с полиакриламидным гелем с нанесенными образцами. Образцы 1 и 3 представляют собой маркеры для низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений соответственно. Образец 2 представляет собой разведенную пробу полученного фибриногена с концентрацией общего белка примерно 2 г/л. На рисунке видно, как α -, β - и γ -цепи человеческого фибриногена с массой 68, 56 и 46 кД соответствующим образом разделяются при электрофорезе. Полученные данные проведенного электрофореза свидетельствуют о высокой чистоте целевого продукта.

Обсуждение

Использование плазмы крови человека в качестве основного сырья для производства КП обеспечивает наилучшую физиологическую совместимость компонентов биологического адгезива с организмом больного.

Для подавления активации факторов протромбинового комплекса полученный криопреципитат растворяли в присутствии нефракционированного гепарина. Поскольку факторы протромбинового комплекса в физиологических условиях проявляют сильное сродство к отрицательно заряженным поверхностям, то, используя это свойство, была проведена обработка специфическими сорбентами, направленная на удаление предшественников сериновых протеаз. Одним из таких сорбентов является гидроксид алюминия.

Фибриноген, как и другие биологические молекулы (белки, аминокислоты), при достижении значения своей изоэлектрической точки чаще всего выпадает

в осадок. Фибриноген-содержащую пасту в виде осадка после центрифугирования растворяли при интенсивном перемешивании в буфере, содержащем антикоагулирующий агент цитрат натрия. pH выводили из значения изоэлектрической точки фибриногена для ускорения процесса растворения.

Задачей настоящей работы являлось обеспечение оптимальных параметров в процессе выделения целевого белка, поэтому были оптимизированы основные параметры, такие как температура растворения фибриногена и pH растворов на различных стадиях процесса, а также концентрация глицина на стадии переосаждения фибриногена. Для очистки концентрата фибриногена от продуктов вирусной инактивации и инактивирующих агентов полученный раствор подвергали процедуре экстракции вазелиновым маслом при интенсивном перемешивании с последующим центрифугированием. Температуру при осаждении понижали до 4 °С, поскольку известно, что фибриноген является криоглобулиновым белком и лучше осаждается при пониженной температуре.

В дальнейшем последовали процедуры стерильной фильтрации, розлива и лиофилизации. Фибриноген сохраняет значительное количество воды даже после лиофилизации. Фибриноген образует с водой комплекс, в котором участвуют 174 молекулы воды на одну молекулу фибриногена, причем молекулы воды являются структурно запертыми в каждой молекуле белка, имея возможность высвободить воду только в случае растяжения или сжатия молекулы белка [11, 12]. При лиофилизации фибриногена до полной обезвоженности следует учитывать, сколько воды сухой порошок фибриногена сможет впитать, чтобы восстановиться до применимого состояния за разумное время. С практической точки зрения растворение порошка сухого фибриногена в водном буфере лучше проводить, просто позволяя порошку абсорбировать воду, таким образом позволяя белку медленно растворяться без перемешивания или встряхивания [11–13]. Полученные результаты SDS-PAGE электрофореза свидетельствуют о высокой чистоте полученного продукта.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан лабораторный метод получения стабильного высокоочищенного вирус-безопасного концентрата фибриногена, применимый для малых и больших объемов исходного сырья для производства препарата фибриногена. Проведена оптимизация таких технологических показателей процесса выделения, как температура растворения фибриногена, pH, концентрация глицина. Разработанный метод характеризуется высоким выходом целевого продукта и снижением трудоемкости за счет исключения приготовления необходимых в других методах сложных буферных растворов и их последующего отмывания, что обуславливает отсутствие значительных потерь целевого продукта в ходе выделения.

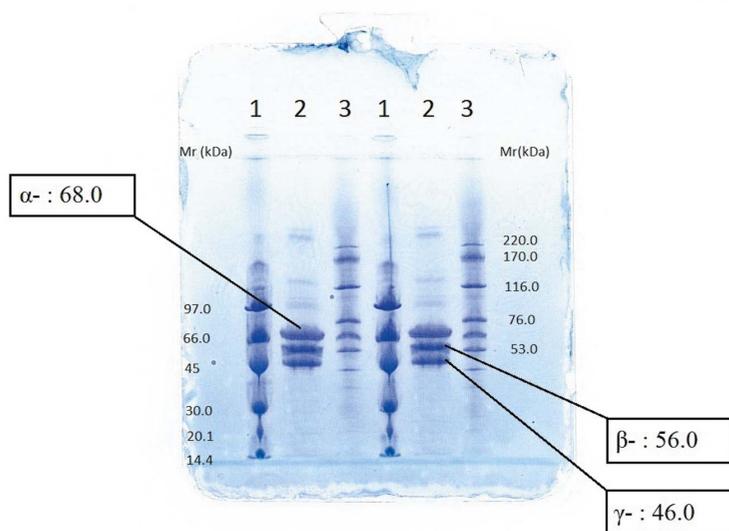


Рисунок 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях
Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions

Литература

1. Redman C., Xia H. Fibrinogen biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 480–95.
2. Козлов А.А., Берковский А.Л., Качалова Н.Д. и др. Пособие для врачей-лаборантов по методам исследования плазменного гемостаза. Факторы свертывания крови. М.: Ренам; 2008.
3. Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза. Киев; 1993.
4. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань; 2000.
5. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1894–904.
6. Крайнова Т.А., Пискарева Ю.К., Анастасиев В.В. Препараты крови. Инструктивно-методические материалы по контролю и производству. М.; 1976.
7. Инструкция по проведению донорского прерывистого плазмафереза. Утверждена Министерством здравоохранения России 23.09.2002.
8. Технический Регламент «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии». Утвержден Постановлением Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 г. № 29.
9. Billy D., Speijer H., Zwaal R.F.A., et al. Anticoagulant and membrane-degrading effects of secretory (non-pancreatic) phospholipase A2, are inhibited in plasma. *Thromb. Haemost.* 2002; 87: 978–84.
10. Yermolenko I.S., Lishko V.K., Ugarova T.P., Magonov S.N. High-resolution visualization of fibrinogen molecules and fibrin fibers with atomic force microscopy. *Biomacromolecules.* 2011; 12: 70–9.
11. Brown J.H., Volkmann N., Jun G., et al. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 85–90.
12. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., Weisel J.W. Forced unfolding of coiled-coils in fibrinogen by single-molecule AFM. *Biophys J.* 2007; 92: 39–41.
13. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., et al. Multi-scale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science.* 2009; 325: 741–4.

Информация об авторах

Хурдин Вячеслав Викторович*, аспирант ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», кафедра биотехнологии и промышленной фармации,
e-mail: khurdin90@gmail.com

Берковский Арон Леонидович, кандидат биологических наук, консультант ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: aron_56@mail.ru

Сергеева Елена Владимировна, заведующая производством НПО «Ренам» МБООИ «Общество больных гемофилией»,
e-mail: serg_helen@mail.ru

Суворов Александр Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НПО «Ренам» МБООИ «Общество больных гемофилией»,
e-mail: suvorov1983@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку

Поступила 17.05.2018

Принята к печати 24.12.2018

References

1. Redman C., Xia H. Fibrinogen biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 480–95.
2. Kozlov A.A., Berkovskij A.L., Kachalova N.D., et al. The manual for laboratory assistant on methods of studying plasma hemostasis. Coagulation factors. Moscow: Renam; 2008 (In Russian).
3. Bratchik A.M. Clinical problems of fibrinolysis. Kiev; 1993 (In Russian).
4. Zubairov D.M. Molecular basis of blood clotting and thrombus formation. Kazan; 2000 (In Russian).
5. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1894–904.
6. Krajnova T.A., Piskareva Yu.K., Anastasiev V.V. Blood medicine. Instructive and methodological materials for control and production. Moscow; 1976 (In Russian).
7. Instruction for conducting donor intermittent plasmapheresis. The Ministry of Health of Russia, 23.09.2002 (In Russian).
8. Technical Regulations on blood safety requirements, its products, blood-substituting solutions and technical equipment used in transfusion-infusion therapy. Approved RF Government Decree of 26 January. 2010, № 29 (In Russian).
9. Billy D., Speijer H., Zwaal R.F.A., et al. Anticoagulant and membrane-degrading effects of secretory (non-pancreatic) phospholipase A2, are inhibited in plasma. *Thromb. Haemost.* 2002; 87: 978–84.
10. Yermolenko I.S., Lishko V.K., Ugarova T.P., Magonov S.N. High-resolution visualization of fibrinogen molecules and fibrin fibers with atomic force microscopy. *Biomacromolecules.* 2011; 12: 70–9.
11. Brown J.H., Volkmann N., Jun G., et al. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 85–90.
12. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., Weisel J.W. Forced unfolding of coiled-coils in fibrinogen by single-molecule AFM. *Biophys J.* 2007; 92: 39–41.
13. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., et al. Multi-scale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science.* 2009; 325: 741–4.

Information about the authors

Vyacheslav V. Khurdin*, Postgraduate Researcher, MIREA – Russian Technological University, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy,
e-mail: khurdin90@gmail.com

Aron L. Berkovsky, Cand. Sci. (Med.), Consultant, National Research Center for Hematology,
e-mail: aron_56@mail.ru

Elena V. Sergeeva, Production Manager, NPO Renam “Society of Hemophilia Patients”,
e-mail: serg_helen@mail.ru

Alexander V. Suvorov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, NPO Renam “Society of Hemophilia Patients”,
e-mail: suvorov1983@mail.ru

* Corresponding author

Received 17 May 2018

Accepted 24 Dec 2018

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-79-89>

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ БОРТЕЗОМИБ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИИ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Назарова Е. Л.^{*}, Минаева Н. В., Зотина Е. Н., Докшина И. А., Сухорукова Э. Е., Шардаков В. И.

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», 610027, Киров, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Режимы терапии с использованием бортезомиба способствовали значительному улучшению выживаемости больных множественной миеломой (ММ), но могут осложняться периферической полинейропатией (ПП).

Цель работы — выявить группу риска развития бортезомиб-индуцированной ПП на основании анализа полиморфизма генов иммунного ответа у больных с впервые диагностированной ММ.

Материалы и методы. С использованием подхода выявления генов-кандидатов проведено исследование ассоциации 20 полиморфных локусов 14 генов иммунного ответа у 46 больных ММ, получавших терапию VCD, включающую в себя бортезомиб.

Результаты. Распределение однонуклеотидных полиморфизмов сравнили в группах больных ММ с наличием и отсутствием ПП. Среди больных с ПП чаще встречались гомозиготные носители аллеля «дикого» типа генов *TLR6* (Ser-249Pro) ($p = 0,006$), *IL1β* (G-1473C) ($p = 0,04$), *IL4* (C-589T) ($p = 0,04$), а также носители гаплотипов с мутантным аллелем гена *IL10* (G-1082A) ($p = 0,04$) и с аллелем «дикого» типа гена *IL2* (T-330G) ($p = 0,01$).

Заключение. Подтвержден вклад генетической компоненты в риск развития бортезомиб-индуцированной нейропатии, что может оказать помощь в персонализации терапии больных ММ.

Ключевые слова: множественная миелома, бортезомиб-индуцированная периферическая нейропатия, гены иммунного ответа, полиморфизм генов

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Назарова Е.Л., Минаева Н.В., Зотина Е.Н., Докшина И.А., Сухорукова Э.Е., Шардаков В.И. Молекулярные маркеры бортезомиб-индуцированной полинейропатии у больных множественной миеломой. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 79–89. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-79-89>

MOLECULAR FEATURES OF BORTEZOMIB-INDUCED NEUROPATHY IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Nazarova E. L.^{*}, Minaeva N. V., Zotina E. N., Dokshina I. A., Suhorukova E. E., Shardakov V. I.

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biology Agency of Russia, 610027, Kirov, Russian Federation

ABSTRACT

Background. The regimens of therapy with bortezomib have significantly improved the survival among patients with multiple myeloma (MM). However, the development of peripheral polyneuropathy (PP) resulting from treatment using proteasome inhibitors is still an undesirable event. Risk factors for PP in MM patients include old age, previous neuropathy and use of neurotoxic drugs. Recent studies have established the presence of a genetic component in the mechanism of developing bortezomib-induced neurotoxicity. However, there are conflicting opinions on the role of genetic characteristics in predicting the risk of treatment-induced neuropathy development.

Aim. To identify the risk group of bortezomib-induced PP based on the analysis of gene polymorphism of the immune response in patients with newly-diagnosed MM.

Materials and methods. A study of the association of 20 polymorphic loci of 14 immune response genes in 46 MM patients was conducted using a candidate gene identification approach. All the patients were receiving VCD therapy with bortezomib.

Results. The distribution of single nucleotide polymorphisms was compared in groups of patients with the presence and absence of PP. It is found that homozygous carriers of the wild type allele of the genes *TLR6* (Ser249Pro) ($p = 0.006$), *IL1 β* (G-1473C) ($p = 0.04$), *IL4* (C-589T) ($p = 0.04$), as well as haplotype carriers with the mutant allele of the gene *IL10* (G-1082A) ($p = 0.04$) and with the wild type allele gene *IL2* (T-330G) ($p = 0.01$) were significantly more frequent among PP patients.

Conclusion. Our results have confirmed the contribution of the genetic component to the risk of developing bortezomib-induced neuropathy. These findings can be used for individualization of therapeutic approaches to the treatment of MM patients.

Keywords: multiple myeloma, bortezomib-induced peripheral neuropathy, immune response genes, gene polymorphism

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Nazarova E.L., Minaeva N.V., Zotina E.N., Dokshina I.A., Suhorukova E.E., Shardakov V.I. Molecular features of bortezomib-induced neuropathy in patients with multiple myeloma. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 79–89 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-79-89>

Введение

Появившиеся в последнее десятилетие новые варианты лекарственной терапии множественной миеломы (ММ), в частности применение ингибиторов протеасом и иммуномодулирующих препаратов, изменили парадигму лечения этого заболевания, улучшив ее эффективность в долгосрочной перспективе [1–3]. Бортезомиб — первый препарат из группы ингибиторов протеасом, одобренный для клинического применения в 2003 г. для лечения

ММ [2, 4]. Периферическая полинейропатия (ПП) является серьезным осложнением как самого заболевания, так и терапии бортезомибом [3, 5]. Она существенно влияет на качество жизни больных и зачастую требует снижения дозы препарата, изменения сроков или даже преждевременного прекращения потенциально успешного лечения [2, 6]. Частота развития ПП, индуцированной применением ингибиторов протеасом, колеблется

от 15 до 45 % [7, 8]. Она возникает на протяжении первых пяти циклов лечения, достигая плато к 8-му циклу бортезомиб-содержащей терапии [9]. Подкожное введение бортезомиба снижает вероятность возникновения ПП, но полностью не отменяет его нейротоксичность [7]. К причинам развития ПП при применении бортезомиба относят непосредственное повреждение ганглиев дорзальных корней спинного мозга, митохондриального и эндоплазматического ретикулума, нарушение регуляции гомеостаза Ca^{2+} [6], ингибирование транскрипции фактора роста нервов, стабилизацию микротрубочек, аутоиммунные или воспалительные процессы [2, 6, 10, 11]. Бортезомиб, взаимодействуя с ядерным фактором карра В (nuclear factor-кВ — NF-кВ), приводит к изменению внутриклеточной передачи сигнала, опосредуемого митоген-активируемыми протеинкиназами, регуляции клеточного цикла, препятствует восстановлению ДНК, развитию и функционированию нервной системы, блокирует транскрипцию и апоптоз нервных и опухолевых клеток [2, 9, 12–14].

NF-кВ относится к семейству факторов транскрипции, который обнаруживается при ММ в конститутивно активированной форме. Его присутствие является важным условием роста и прогрессии опухолей, включая гемобластозы [15]. Это связано с тем, что активированный NF-кВ транслоцируется из цитоплазмы в ядро и взаимодействует со специфическими сайтами в области промоторов и энхансеров генов иммунного ответа, ответственных за синтез белков и пептидов, вовлеченных в той или иной степени в реализацию иммунных реакций организма [16]. Белок NF-кВ является дистальным отделом путей сигнальной трансдукции, получающим стимулирующие сигналы через различные адаптеры от паттерн-распознающих рецепторов [15]. Паттерн-распознающие рецепторы — первое звено в сложном механизме распознавания «своего» и «чужого» генетического материала, где в качестве последнего могут выступать опухолевые клетки и молекулы, образующиеся в процессе их деградации [16]. Мутации в генах, кодирующих компоненты сигнального пути NF-кВ, участвующих в развитии иммунных реакций, повышают риск развития ММ, способствуют возникновению резистентности к проводимому лечению, прогрессированию опухолевого роста, появлению осложнений этого заболевания и терапии [15–17].

Цель исследования — выявить группу риска развития бортезомиб-индуцированной ПП на основании анализа полиморфизма генов иммунного ответа у больных с впервые диагностированной ММ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови 46 больных ММ (28 женщин и 18 мужчин) с медианой возраста 60 лет, ранее не получавших лечения лекарственными препаратами, обладающими нейро-

токсическим эффектом. Из них у 3 (6,5 %) больных заболевание находилось в I стадии, у 19 (41,3 %) — во II стадии, у 24 (52,2 %) — в III стадии (по Durie-Salmon [18]). Моноклональный тип секреции IgA наблюдался у 10 (21,7 %) человек, IgG — у 28 (60,9 %) обследованных. Преобладание свободных легких цепей к-типа выявлено у 22 (47,8 %) больных, у 11 (23,9 %) — λ-типа. У остальных тип продукции иммуноглобулинов и свободных легких цепей был неизвестен. Все больные получили лечение с использованием режима VCD (бортезомиб + циклофосфамид + дексаметазон). Бортезомиб вводили в дозе 1,3 мг/м² подкожно в 1, 4, 8 и 11-й дни каждого курса. До получения частичной и/или полной ремиссии в 1-й группе больным проведено от 2 до 12 курсов VCD (медиана — 6 курсов), во 2-й группе — от 2 до 17 (медиана — 5,5) курсов терапии. Информированное добровольное согласие на проведение исследований было получено у всех больных. Все случаи ПП оценены в соответствии с общими терминологическими критериями неблагоприятных событий Национального института рака (версия 3.0) после окончания индукционной терапии. Больных в зависимости от наличия ПП разделили на две группы. В 1-ю группу вошли 12 (26,1 %) больных ММ с ПП. Среди них наблюдались 9 женщин и 3 мужчин в возрасте от 34 до 72 лет (медиана возраста 59 лет). У 2 (16,7 %) больных характер выраженности симптомов был незначителен и отнесен к 1-й степени токсичности, у 8 (66,6 %) — ко 2-й степени, у 2 (16,7 %) — к 3-й степени, что потребовало редукции дозы бортезомиба. Во 2-ю группу включили 34 (73,9 %) больных ММ (19 женщин и 15 мужчин) без клинических признаков бортезомиб-индуцированной ПП в возрасте от 33 до 76 лет (медиана возраста 61 год) (табл. 1).

Генотипирование 20 полиморфных участков 14 генов иммунного ответа *TLR2* (rs5743708), *TLR5* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810), *TLR9* (rs5743836, rs352140), *IL1β* (rs2856841, rs1143623, rs1143634, rs16944), *IL2* (rs2069762), *IL4* (rs2243250), *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800871, rs1800896), *IL17A* (rs2275913), *CD14* (rs34424920), *TNFα* (rs1800629), *FCGR2A* (rs1801274) осуществляли методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами и с электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле («Литех», Россия) в момент постановки диагноза.

Статистические методы. Распределение генотипов по каждому полиморфному локусу проверяли на соответствие равновесию Харди — Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали χ^2 -критерий Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность. Дополнительно оценивали показатель отношения шансов — odds ratio (OR) с вычислением границ 95 %-го доверительного интервала (95 % CI). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Характеристика больных ММ
Table 1. Characteristics of patients with multiple myeloma

Показатель Parameter	1-я группа 1 group	2-я группа 2 group
	(n = 12)	(n = 34)
Пол: Sex:		
- мужчины (%) - male (%)	3 (25)	15 (44,1)
- женщины (%) - female (%)	9 (75)	19 (55,9)
Медиана возраста (Q₁-Q₃) Age, median (Q ₁ -Q ₃)	59 (58-65)	61 (57-65)
Стадия ММ (Durie-Salmon) [18] Durie-Salmon Staging System [18]		
IA	0 (0%)	3 (8,8%)
IIA + IIB	5 (41,7%)	14 (41,2%)
IIIA + IIIB	7 (58,3%)	17 (50%)
Тип секреции Secretion		
- IgA	2 (16,7%)	8 (23,5%)
- IgG	6 (50%)	22 (64,7%)
- нет данных - no data	4 (33,3%)	4 (11,8%)
Свободные легкие цепи Free light chain production		
- κ-тип - kappa	5 (41,7%)	17 (50%)
- λ-тип - lambda	5 (41,7%)	6 (17,6%)
- нет данных - no data	2 (16,6%)	11 (32,4%)
Медиана числа курсов VCD (Q₁-Q₃) Number of VCD courses, Median VCD (Q ₁ -Q ₃)	6 (3-9)	5,5 (4-6)
Периферическая полинейропатия Peripheral neuropathy		
- I степени - I degree	2 (16,7%)	
- II степени - II degree	8 (66,6%)	
- III степени - III degree	2 (16,7%)	

Результаты

Генотипирование полиморфных локусов избранных генов иммунного ответа выявило различия в частоте обнаружения гаплотипов генов *TLR6* (Ser249Pro), *IL1β* (G-1473C), *IL2* (T-330G), *IL4* (C-589T) и *IL10* (G-1082A) у больных 1-й и 2-й групп (табл. 2). Исследование полиморфизма остальных генов: *TLR2* (Arg753Gln), *TLR5* (Phe421Leu), *TLR4* (Asp299Gln, Thr399Ile), *IL1β* (T-31C, T-511C, C-3953T), *IL6* (G-174C), *IL10* (C-819T), *IL17A* (G-197A), *CD14* (C-159T), *TNFα* (G-308A), *FCGR2A* (His166Arg) не обнаружило их участия в возникновении бортезомиб-индуцированной ПП.

При анализе полученных данных отмечено, что группу больных ММ с развитием ПП на фоне использования режима VCD отличало гомозиготное носительство

аллеля «дикого» типа гена *TLR6*-249, гена *IL1β*-1473, гена *IL4*-589, гомозиготное носительство мутантного аллеля гена *IL2*-330 и присутствие мутантного аллеля в гомо- и гетерозиготном состоянии в локусе G-1082 гена *IL10*. Найденные различия повышали риск возникновения бортезомиб-индуцированной ПП у больных ММ в 7, 3, 2, 7 и 4 раза соответственно.

Для поиска возможных гендерных различий проведено сравнение частот носительства аллелей и гаплотипов исследуемых генов среди мужчин и женщин в обеих группах. В группе больных ММ с наличием бортезомиб-индуцированной ПП не обнаружено достоверно значимых отклонений в частоте распределения аллелей во всех 20 полиморфных локусах генов иммунного ответа у мужчин и у женщин, также

Таблица 2. Различия частот носительства гаплотипов ряда генов иммунного ответа у больных ММ в зависимости от наличия бортезомиб-индуцированной ПП
Table 2. Differences in frequency of the carriers of haplotypes of immune response genes in multiple myeloma patients with the presence and absence of bortezomib-induced peripheral polyneuropathy

Ген, генотипы Gene, genotypes	1-я группа 1 group	2-я группа 2 group	χ^2	p	OR	
	(n = 12)	(n = 34)			значение value	95 % CI
TLR6 (Ser249Pro)						
Генотип CC Genotype CC	0,500	0,118	7,62	0,006	7,50	1,61–34,95
Генотипы CT + TT Genotypes CT + TT	0,500	0,882			0,13	0,03–0,62
IL1β (G-1473C)						
Генотип GG Genotype GG	0,500	0,206	4,31	0,04	3,86	0,95–15,71
Генотип GC Genotype GC	0,500	0,706			0,42	0,11–1,61
Генотип CC Genotype CC	0,000	0,088			0,36	0,02–7,49
IL2 (T-330G)						
Генотипы TT + TG Genotypes TT + TG	0,583	0,912	6,66	0,01	0,14	0,03–0,71
Генотип GG Genotype GG	0,417	0,088		7,38	1,42–38,42	
IL4 (C-589T)						
Генотип CC Genotype CC	0,417	0,206	4,13	0,04	2,76	0,67–11,37
Генотип CT Genotype CT	0,583	0,559			1,11	0,29–4,19
Генотип TT Genotype TT	0,000	0,235			0,12	0,01–2,34
IL10 (G-1082A)						
Генотип GG Genotype GG	0,333	0,676	4,31	0,04	0,24	0,06–0,97
Генотипы GA + AA Genotypes GA + AA	0,667	0,324			4,18	1,03–16,94

Примечание. Здесь и далее: результаты представлены в долях единицы; χ^2 — критерий Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность; p — уровень значимости различий; OR (odds ratio) — отношение шансов; 95 % CI — доверительный интервал, в котором статистическая значимость различий параметра, полученного на основе исследования, имеет вероятность 95 %.

Note. Hereinafter: the results are presented in fractions of a unit; χ^2 — Pearson’s Yates Correction Test for Continuity; p — the significance of differences; OR — odds ratio; 95 % CI — confidence interval, across which the statistical significance of differences in parameters obtained has a probability degree of 95 %.

как и у мужчин 1-й и 2-й групп. Однако среди женщин обеих групп (в зависимости от наличия и отсутствия клинических признаков ПП) выявлены отличия, затрагивающие полиморфные локусы генов *TLR6*, *IL10-819*, *IL2* (табл. 3).

Отмечено, что гомозиготное носительство аллеля «дикого» типа гена *TLR6* (Ser249Pro), мутантного аллеля гена *IL2* (T-330G) и присутствие гетерозигот *IL10* (G-1082A), повышало риск обнаружения бортезомиб-ассоциированной ПП у женщин с ММ более чем в 10 ($p = 0,01$), 14 ($p = 0,01$) и в 5 раз ($p = 0,04$) соответ-

ственно. Найденные гендерные различия среди больных ММ рекомендуется учитывать при проведении исследований дизайна «случай-контроль».

Обсуждение

Развитие токсичности лекарственных препаратов, применяемых при лечении онкогематологических заболеваний, в ряде случаев ограничивает достижение полного и устойчивого терапевтического эффекта. Многочисленные генетические исследования при ММ в основном касались выявления генов-кандидатов,

Таблица 3. Оценка риска развития ПП у женщин с ММ на фоне бортезомиб-содержащих режимов терапии
Table 3. Assessment of PP risk in MM women against the background of bortezomib treatment

Ген, генотипы Gene, genotype	1-я группа 1 group	2-я группа 2 group	χ^2	p	OR	
	(n = 9)	(n = 19)			значение value	95 % CI
TLR6 (Ser249Pro)						
Генотип CC Genotype CC	0,556	0,105	6,60	0,01	10,63	1,48–76,08
Генотипы CT + TT Genotypes CT + TT	0,444	0,895			0,09	0,01–0,67
IL10 (G-1082A)						
Генотип GG Genotype GG	0,333	0,737	4,17	0,04	0,18	0,03–1,00
Генотипы GA + AA Genotypes GA + AA	0,667	0,263			5,60	1,00–31,32
IL2 (T-330G)						
Генотипы TT + TG Genotypes TT + TG	0,556	0,947	6,39	0,01	0,07	0,01–0,77
Генотип GG Genotype GG	0,444	0,053			14,40	1,30–159,52

прогнозирующих характер течения заболевания, однако ни одной группе генетических маркеров не удалось завоевать первенство в качестве показателей эффективности и безопасности специфической терапии [9, 17, 19–21].

Лекарственно-индуцированной ПП, с точки зрения фармакогеномики, в последние годы также уделяется большое внимание. В связи с растущим интересом к персонализированной медицине считается, что этот подход позволит выявить больных, у которых имеются вариации отдельных генов, увеличивающих риск развития ПП, связанной с терапией, и при необходимости модифицировать лечение. Недавно опубликован краткий обзор генов и точечных мутаций в них, которые могут выступать в качестве прогностических маркеров развития ПП [3]. К сожалению, результаты таких исследований зачастую противоречивы. Тем не менее это направление исследований является весьма перспективным, хотя и требует анализа значительного числа наблюдений, поскольку в большинстве работ основное внимание уделяется генам, участвующим в развитии неопластических процессов, а не генам, которые непосредственно способствуют возникновению ПП с вовлечением иммунных механизмов [3, 6, 22, 23].

В представленном исследовании была проанализирована частота распределения гаплотипов 14 генов иммунного ответа в 20 полиморфных локусах у 46 больных ММ, получивших лечение по схеме VCD, и оценена связь мутационного статуса исследованных генов с развитием лекарственно-индуцированной ПП. Данный подход позволил идентифицировать пять гаплотипов в генах *TLR6*, *IL1 β* (G-1473C), *IL2*, *IL4* и *IL10*

(G-1082A), носительство которых увеличивает риск развития ПП, что подтверждается выявлением статистически значимых различий.

В проведенных ранее работах, в которых изучалась роль полиморфизма генов иммунного ответа в возникновении ПП при ММ, лишь С. Самро и соавт. [3] описали связь между возникновением этого осложнения и мутационным статусом генов двух цитокинов *IL10* и *IL17*. В целом мутации в этих генах влияют на конечный уровень их транскрипции и приводят к изменению продукции кодируемых ими белков [24]. При гемобластозах опухолевые клетки, с одной стороны, способны самостоятельно продуцировать цитокины, снижая эффективность лекарственных препаратов, способствуя выживанию и росту опухолевых клеток. С другой — рост опухолевого клона регулируется цитокинами, индуцирующими или ингибирующими пролиферацию трансформированных клеток [25].

Описано примерно 49 полиморфизмов гена *IL10* [26]. Один из них — *IL10-1082A>G* локализован в проксимальной области промотора [24], который может играть важную роль в развитии ММ [27], так как IL-10 является фактором роста, в том числе для трансформированных плазматических клеток, аутокринно индуцируя продукцию онкостатина М. К тому же найдено, что высокие сывороточные концентрации интерлейкина-10 у больных ММ сопровождают прогрессирование заболевания. М. Rudzianskiene и соавт. [28] установили, что больные ММ, несущие гетерозиготный гаплотип гена *IL10-1082*, имели более выраженный ответ на проводимую радиотерапию очагов миеломного поражения костной ткани, чем больные с другими

генотипами. Больные с гомозиготным гаплотипом гена *IL-1082* с присутствием аллеля «дикого» типа гена *IL10* были склонны к более быстрому облегчению болевого синдрома (в первые 4 недели проведения лучевой терапии). Нами ранее найдено, что присутствие генотипов с мутантным аллелем гена *IL10* (G-1082A) увеличивало риск возникновения ММ в 14 раз [29], чего, однако, не наблюдалось в исследованиях С. Zheng и соавт. и G. Mazur и соавт. [30, 31]. В представленном здесь исследовании тот же «прогностически неблагоприятный» мутантный статус гена *IL10-1082* ассоциировался с повышенной частотой обнаружения ПП (в 4 раза) у больных ММ при использовании бортезомиб-содержащего режима терапии VCD.

В группу повышенного риска развития ПП также вошли носители гомозиготного гаплотипа с аллелем «дикого» типа гена *IL4*. Интерлейкин-4 подавляет провоспалительную активность макрофагов и секрецию ими интерлейкинов -1, -6 и фактора некроза опухоли, то есть так же, как и интерлейкин-10, оказывает противовоспалительный эффект. С учетом того, что интерлейкин-4 поляризует иммунный ответ, патологический процесс может носить различный характер. При снижении выработки интерлейкина-4 моноцитами и макрофагами продукция провоспалительных цитокинов не блокируется и происходит переключение иммунного ответа на Th1-тип реагирования. Полиморфизм гена *IL4* в большинстве случаев ассоциирован с повышенной промоторной активностью гена и увеличением продукции интерлейкина-4. Это приводит к ингибированию функции макрофагов/моноцитов, к снижению экспрессии FcR всех трех типов, к угнетению антителозависимых цитотоксичности и фагоцитоза, к переключению иммунного ответа с Th1- на Th2-тип реагирования, для которого характерна стимуляция поликлональной активации В-лимфоцитов [2]. Вероятно, обнаруженное в настоящем исследовании гомозиготное носительство аллеля «дикого» типа гена *IL4* не способно блокировать реализацию провоспалительного иммунного ответа при развитии ПП у больных ММ.

Среди провоспалительных цитокинов у больных ММ с бортезомиб-индуцированной полинейропатией в настоящей работе выявлена высокая частота обнаружения «диких» гомозигот гена *IL1β* (G-1473C) ($p = 0,04$) и мутантных гомозигот гена *IL2* (T-330G) ($p = 0,01$). Показано, что опухолевые клетки при ММ высоко экспрессируют интерлейкин-1β [32], что может быть связано с наличием мутаций в гене. Однако в представленном здесь исследовании видно, что развитие ПП у больных ММ, леченных при помощи бортезомиба, напротив, наблюдалось чаще у носителей только аллеля «дикого» типа *IL1β* (G-1473C). Структура гена *IL1β* весьма сложна. Он содержит 22 экзона и 9 интронов, подавляющее число которых являются альтернативными. Для этого гена характерна высокая

степень гомологии интронных последовательностей, что, как предполагается, играет важную регуляторную роль в экспрессии этого гена [33].

Изменения в области промотора гена *IL2* приводят к модификации его транскрипционной активности. Результаты исследования Т. Watanabe и соавт. [34] продемонстрировали менее чем 3-кратное повышение уровня фитогемагглютинин индуцированной экспрессии мРНК *IL2* у больных с бортезомиб-индуцированной ПП. Тогда как у большинства больных без клинических симптомов данного осложнения уровень экспрессии мРНК *IL2* после введения бортезомиба превышал более чем в 3 раза исходные значения. Таким образом, исследователи подтвердили гипотезу о том, что развитие ПП при лечении бортезомибом может быть связано с участием генов, регулирующих течение воспалительных процессов.

Экспрессия TLRs, как и рецепторов к цитокинам, обнаруживается и на неизмененных, и на опухолевых клетках. TLRs могут быть причастны к злокачественной трансформации гемопоэтических клеток, прогрессии роста опухоли и к ее уклонению от иммунного надзора [35]. В представленном исследовании найдено, что у гомозиготных носителей аллеля «дикого» типа гена *TLR6* риск развития ПП на фоне применения бортезомиба был выше, чем в случаях выявления гаплотипов с мутантным аллелем ($p = 0,006$). Предполагается, что в данном случае аллель «дикого» типа выступал в качестве аллеля риска развития неблагоприятного осложнения лечения — ПП.

В результате поиска ассоциаций полиморфных замков в исследуемых генах с предполагаемым фенотипическим эффектом были найдены гендерные особенности, затрагивающие гены *TLR5* и *TLR4* (Asp299Gln) у больных обоего пола, получивших терапию VCD без признаков ПП. Среди мужчин с ММ, в отличие от женщин, достоверно чаще встречались гомозиготные носители аллеля «дикого» типа гена *TLR5* ($p = 0,007$) и мутантного аллеля гена *TLR4* (Asp299Gln). TLR3 располагается в эндосомах клеток и может связываться с такими экзогенными патоген-ассоциированными паттернами, как двуспиральная РНК вирусов, а также с эндогенными веществами, образующимися в процессе повреждения тканей: двуспиральной и матричной РНК. Активация TLR3 индуцирует запуск NF-κB и продукцию интерферонов I типа. Установлено, что неизмененные и трансформированные клетки при ММ или вовсе не несут TLR3, или его экспрессия выявляется на очень низком уровне, что, вероятно, может быть связано с особенностями мутационного статуса гена, кодирующего данный рецептор [36]. Известно, что при ММ активация TLR4 способна усиливать пролиферацию и формировать устойчивость опухолевых плазматических клеток к химиотерапии, а также увеличивать количество регуляторных Т-клеток [37]. Таким образом,

изучение особенностей формирования противоопухолевого иммунитета играет важную роль в попытках улучшить результаты лечения ММ.

В работе также установлено, что для женщин с ММ, получивших терапию VCD, характерными генетическими маркерами риска развития ПП являлись: гомозиготное носительство аллеля «дикого» типа гена *TLR6* ($p = 0,01$), мутантного аллеля гена *IL2* ($p = 0,01$) и гаплотипы с мутантным аллелем гена *IL10* в локусе -1082 ($p = 0,04$). Наряду с уже ранее описанными характеристиками полиморфного статуса генов *IL2* и *IL10*, участие гена *TLR6*, вероятно, тесно ассоциировано с его ролью не только в установлении глубины ответа при лечении ММ, но и развитием осложнений этой терапии.

Возникновение ПП у больных ММ весьма трудно предупредить, поскольку на основании только клинических симптомов невозможно спрогнозировать, какие больные подвергаются более высокому риску развития данного осложнения. Попытки определить генетические факторы высокого риска развития ПП основаны на анализе ограниченного числа генов. Плохая прогностическая ценность таких классификаторов связана с отсутствием простых, широко признанных методов их обнаружения, которые могут использоваться при риск-адаптированной терапии больных. В настоящем исследовании использовали ассоциативный подход для прогнозирования риска развития бор-

тезомиб-индуцированной ПП с мутационным статусом ряда генов иммунного ответа с целью обнаружить ключевые из них.

Полученные результаты согласуются с гипотезой о том, что риск развития ПП на фоне лечения бортезомибом может быть опосредован мутациями в генах, регулирующих механизмы развития иммунного ответа. Эти данные могут способствовать разработке будущих нейропротективных стратегий при терапии бортезомибом. Итоги цитогенетической/интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации уже используются для принятия решений в аспекте выбора способа лечения ММ. Анализ профилей риска токсичности на основании оценки полиморфного статуса генов в перспективе будет включен в алгоритмы лечения. Идентификация рисков неблагоприятного воздействия бортезомиба приведет не только к более широкому применению нейропротективных препаратов и с профилактической целью — противовоспалительных средств, но и позволит индивидуализировать схемы и дозы применения бортезомиба. Однако осторожно необходимо подходить к переносу результатов генетического определения риска токсичности в клиническую практику, так как снижение дозы препарата уменьшит эффективность лечения, что окажет влияние на выживаемость и качество жизни больных при прогрессии заболевания.

Литература

1. García-Sanz R., Corchete L.A., Alcoceba M., et al. GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study group. Prediction of peripheral neuropathy in multiple myeloma patients receiving bortezomib and thalidomide: a genetic study based on a single nucleotide polymorphism array. *Hematol. Oncol.* 2016; 9: 1–6. DOI: 10.1002/hon.2337
2. Starobova H., Vetter I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Front. Mol. Neurosci.* 2017; 10: 174. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00174
3. Campo C., Da Silva Filho M.I., Weinhold N., et al. Genetic susceptibility to bortezomib-induced peripheral neuropathy: replication of the reported candidate susceptibility loci. *Neurochem. Res.* 2017; 42(3): 925–31. DOI: 10.1007/s11064-016-2007-9
4. Adams J., Palombella V.J., Sausville E.A., et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; 59(11): 2615–22.
5. Becker P.S. Genetic predisposition for chemotherapy-induced neuropathy in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(7): 783–6. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.4771
6. Boyette-Davis J.A., Walters E.T., Dougherty P.M. Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. *Pain Manag.* 2015; 5(4): 285–96. DOI: 10.2217/pmt.15.19
7. Magrangeas F., Kuiper R., Avet-Loiseau H., et al. A genome-wide association study identifies a novel locus for bortezomib-induced peripheral neuropathy in European patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(17): 4350–5. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3163

References

1. García-Sanz R., Corchete L.A., Alcoceba M., et al. GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study group. Prediction of peripheral neuropathy in multiple myeloma patients receiving bortezomib and thalidomide: a genetic study based on a single nucleotide polymorphism array. *Hematol. Oncol.* 2016; 9: 1–6. DOI: 10.1002/hon.2337
2. Starobova H., Vetter I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Front. Mol. Neurosci.* 2017; 10: 174. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00174
3. Campo C., Da Silva Filho M.I., Weinhold N., et al. Genetic susceptibility to bortezomib-induced peripheral neuropathy: replication of the reported candidate susceptibility loci. *Neurochem. Res.* 2017; 42(3): 925–31. DOI: 10.1007/s11064-016-2007-9
4. Adams J., Palombella V.J., Sausville E.A., et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; 59(11): 2615–22.
5. Becker P.S. Genetic predisposition for chemotherapy-induced neuropathy in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(7): 783–6. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.4771
6. Boyette-Davis J.A., Walters E.T., Dougherty P.M. Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. *Pain Manag.* 2015; 5(4): 285–96. DOI: 10.2217/pmt.15.19
7. Magrangeas F., Kuiper R., Avet-Loiseau H., et al. A genome-wide association study identifies a novel locus for bortezomib-induced peripheral neuropathy in European patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(17): 4350–5. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3163

8. Argyriou A.A., Cavaletti G., Bruna J., et al. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: an update. *Arch. Toxicol.* 2014; 88(9): 1669–79. DOI: 10.1007/s00204-014-1316-5
9. Meregalli C. An Overview of Bortezomib-Induced Neurotoxicity. *Toxics.* 2015; 3: 294–303. DOI: 10.3390/toxics3030294
10. Landowski T.H., Megli C.J., Nullmeyer K.D., et al. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res.* 2005; 65(9): 3828–36.
11. Ghelardini C., Menicacci C., Cerretani D., Bianchi E. Spinal administration of mGluR5 antagonist prevents the onset of bortezomib induced neuropathic pain in rat. *Neuropharmacology.* 2014; 86: 294–300. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.004
12. Alé A., Bruna J., Calls A., et al. Inhibition of the neuronal NFκB pathway attenuates bortezomib-induced neuropathy in a mouse model. *Neurotoxicology.* 2016; 55: 58–64. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.05.004
13. Bilińska M., Usnarska-Zubkiewicz L., Pokryszko-Dragan A. Bortezomib-induced painful neuropathy in patients with multiple myeloma. *Contemp. Oncol. (Pozn).* 2013; 17(5): 421–6. DOI: 10.5114/wo.2013.37214
14. Morawska M., Grzasko N., Kostyra M., et al. Therapy-related peripheral neuropathy in multiple myeloma patients. *Hematol. Oncol.* 2015; 33(4): 113–9. DOI: 10.1002/hon.2149
15. Назарова Е.Л., Шардаков В.И. Полиморфизм генов толл-подобных рецепторов при гемобластозах. *Цитокины и воспаление.* 2017; 16(4): 13–20.
16. Назарова Е.Л., Шардаков В.И. Роль полиморфизма генов сигнальных путей толл-подобных рецепторов в развитии гемобластозов. *Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.* 2017; 24(3): 7–21.
17. Favis R., Sun Y., van de Velde H., et al. Genetic variation associated with bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Pharmacogenet. Genomics.* 2011; 21(3): 121–9. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283436b45
18. Durie B.G.M., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer.* 1975; 36(3): 842–54.
19. Mitra A.K., Harding T., Mukherjee U.K., et al. A gene expression signature distinguishes innate response and resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2017; 7(6): 581. DOI: 10.1038/bcj.2017.56
20. Corthals S.L., Kuiper R., Johnson D.C., et al. Genetic factors underlying the risk of bortezomib induced peripheral neuropathy in multiple myeloma patients. *Haematologica.* 2011; 96(11): 1728–32. DOI: 10.3324/haematol.2011.041434
21. Campo C., da Silva Filho M.I., Weinhold N., et al. Bortezomib-induced peripheral neuropathy: A genome-wide association study on multiple myeloma patients. *Hematol. Oncol.* 2017; 3: 1–6. DOI: 10.1002/hon.2391
22. Beutler A.S., Kulkarni A.A., Kanwar R., et al. Sequencing of Charcot – Marie – Tooth disease genes in a toxic polyneuropathy. *Ann. Neurol.* 2014; 76(5): 727–37. DOI: 10.1002/ana.24265
23. Weis J., Claeys K.G., Roos A., et al. Towards a functional pathology of hereditary neuropathies. *Acta Neuropathol.* 2017; 133(4): 493–515. DOI: 10.1007/s00401-016-1645-y
24. Domingo-Domènech E., Benavente Y., González-Barca E., et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica.* 2007; 92(11): 1475–81.
25. Mutlu P., Yalcin S., Elci P., et al. Association of -174G/C interleukin-6 gene polymorphism with the risk of chronic lymphocytic, chronic myelogenous and acute myelogenous leukemias in Turkish patients. *J. BUON.* 2014; 19(3): 787–91.
26. Moore E.E., Presnell S., Garrigues U., et al. Expression of IL-17B in neurons and evaluation of its possible role in the chromosome 5q-linked form of Charcot-
8. Argyriou A.A., Cavaletti G., Bruna J., et al. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: an update. *Arch. Toxicol.* 2014; 88(9): 1669–79. DOI: 10.1007/s00204-014-1316-5
9. Meregalli C. An Overview of Bortezomib-Induced Neurotoxicity. *Toxics.* 2015; 3: 294–303. DOI: 10.3390/toxics3030294
10. Landowski T.H., Megli C.J., Nullmeyer K.D., et al. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res.* 2005; 65(9): 3828–36.
11. Ghelardini C., Menicacci C., Cerretani D., Bianchi E. Spinal administration of mGluR5 antagonist prevents the onset of bortezomib induced neuropathic pain in rat. *Neuropharmacology.* 2014; 86: 294–300. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.004
12. Alé A., Bruna J., Calls A., et al. Inhibition of the neuronal NFκB pathway attenuates bortezomib-induced neuropathy in a mouse model. *Neurotoxicology.* 2016; 55: 58–64. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.05.004
13. Bilińska M., Usnarska-Zubkiewicz L., Pokryszko-Dragan A. Bortezomib-induced painful neuropathy in patients with multiple myeloma. *Contemp. Oncol. (Pozn).* 2013; 17(5): 421–6. DOI: 10.5114/wo.2013.37214
14. Morawska M., Grzasko N., Kostyra M., et al. Therapy-related peripheral neuropathy in multiple myeloma patients. *Hematol. Oncol.* 2015; 33(4): 113–9. DOI: 10.1002/hon.2149
15. Nazarova E.L., Shardaков V.I. Polymorphism of Toll-like receptor genes in hematological malignancies. *Цитокины и воспаление.* 2017; 16(4): 13–20 (In Russian).
16. Nazarova E.L., Shardaков V.I. Role of polymorphisms of Toll-like receptors signaling pathway genes in the development of hematological malignancies. *Uchenye zapiski Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta imeni akademika I.P. Pavlova.* 2017. 24(3): 7–21 (In Russian).
17. Favis R., Sun Y., van de Velde H., et al. Genetic variation associated with bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Pharmacogenet. Genomics.* 2011; 21(3): 121–9. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283436b45
18. Durie B.G.M., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer.* 1975; 36(3): 842–54.
19. Mitra A.K., Harding T., Mukherjee U.K., et al. A gene expression signature distinguishes innate response and resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2017; 7(6): 581. DOI: 10.1038/bcj.2017.56
20. Corthals S.L., Kuiper R., Johnson D.C., et al. Genetic factors underlying the risk of bortezomib induced peripheral neuropathy in multiple myeloma patients. *Haematologica.* 2011; 96(11): 1728–32. DOI: 10.3324/haematol.2011.041434
21. Campo C., da Silva Filho M.I., Weinhold N., et al. Bortezomib-induced peripheral neuropathy: A genome-wide association study on multiple myeloma patients. *Hematol. Oncol.* 2017; 3: 1–6. DOI: 10.1002/hon.2391
22. Beutler A.S., Kulkarni A.A., Kanwar R., et al. Sequencing of Charcot – Marie – Tooth disease genes in a toxic polyneuropathy. *Ann. Neurol.* 2014; 76(5): 727–37. DOI: 10.1002/ana.24265
23. Weis J., Claeys K.G., Roos A., et al. Towards a functional pathology of hereditary neuropathies. *Acta Neuropathol.* 2017; 133(4): 493–515. DOI: 10.1007/s00401-016-1645-y
24. Domingo-Domènech E., Benavente Y., González-Barca E., et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica.* 2007; 92(11): 1475–81.
25. Mutlu P., Yalcin S., Elci P., et al. Association of -174G/C interleukin-6 gene polymorphism with the risk of chronic lymphocytic, chronic myelogenous and acute myelogenous leukemias in Turkish patients. *J. BUON.* 2014; 19(3): 787–91.
26. Moore E.E., Presnell S., Garrigues U., et al. Expression of IL-17B in neurons and evaluation of its possible role in the chromosome 5q-linked form of Charcot-

Marie-Tooth disease. *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12(2): 141–50.

27. Howell W.M., Rose-Zerilli M.J. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *J. Nutr.* 2007; 137(1): 194–9.

28. Rudzianskiene M., Inciura A., Juozaityte E., et al. The role of single nucleotide polymorphism of IL-6 and IL-10 cytokine on pain severity and pain relief after radiotherapy in multiple myeloma patients with painful bone destructions. *Genetika.* 2014; 46(2): 455–69.

29. Назарова Е.Л., Демьянова В.Т., Шардаков В.И. и др. Ассоциации полиморфизма ряда генов врожденного иммунитета с риском развития множественной миеломы и хронического лимфолейкоза. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(4): 183–9.

30. Zheng C., Huang D., Liu L., et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in multiple myeloma. *Int. J. Cancer.* 2001; 95(3): 184–8.

31. Mazur G., Bogunia-Kubik K., Wróbel T., et al. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. *Immunol. Lett.* 2005; 96(2): 241–6.

32. Brown E.E., Lan Q., Zheng T., et al. Common variants in genes that mediate immunity and risk of multiple myeloma. *Int. J. Cancer.* 2007; 120: 2715–22. DOI: org/10.1002/ijc.22618

33. Чурносов М.И., Сиротина С.С., Тикунова Т.С. и др. *Гены цитокинов и хронический лимфолейкоз.* М.: ПАМН; 2014: 132 с.

34. Watanabe T., Mitsuhashi M., Sagawa M., et al. Phytohemagglutinin-induced IL2 mRNA in whole blood can predict bortezomib-induced peripheral neuropathy for multiple myeloma patients. *Blood Cancer J.* 2013; 3: 150. DOI: 10.1038/bcj.2013.47

35. Isaza-Correa J.M., Liang Z., van den Berg A., et al. Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. *J. Hematol. Oncol.* 2014; 7: 57–67. DOI: 10.1186/s13045-014-0057-5

36. National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

37. Ellyard J.I., Simson L., Parish C.R. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens.* 2007; 70(1): 1–11. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2007.00869.x

Информация об авторах

Назарова Елена Львовна*, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»,

e-mail: nazarova@niigpk.ru;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9890-4264>

Минаева Наталья Викторовна, кандидат медицинских наук, заместитель директора по лечебной работе ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»,

e-mail: minaeva@niigpk.ru;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8479-3217>

Зотина Екатерина Николаевна, кандидат медицинских наук, руководитель научно-клинического отдела ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»,

e-mail: zotina@niigpk.ru;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9692-2541>

Marie-Tooth disease. *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12(2): 141–50.

27. Howell W.M., Rose-Zerilli M.J. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *J. Nutr.* 2007; 137(1): 194–9.

28. Rudzianskiene M., Inciura A., Juozaityte E., et al. The role of single nucleotide polymorphism of IL-6 and IL-10 cytokine on pain severity and pain relief after radiotherapy in multiple myeloma patients with painful bone destructions. *Genetika.* 2014; 46(2): 455–69.

29. Nazarova E.L., Demyanova V.T., Shardaikov V.I., et al. The association a number of innate immunity genes polymorphism with the risk of developing multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2016; 61(4): 183–9 (In Russian).

30. Zheng C., Huang D., Liu L., et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in multiple myeloma. *Int. J. Cancer.* 2001; 95(3): 184–8.

31. Mazur G., Bogunia-Kubik K., Wróbel T., et al. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. *Immunol. Lett.* 2005; 96(2): 241–6.

32. Brown E.E., Lan Q., Zheng T., et al. Common variants in genes that mediate immunity and risk of multiple myeloma. *Int. J. Cancer.* 2007; 120: 2715–22. DOI: org/10.1002/ijc.22618

33. Churnosov M.I., Sirotnina S.S., Tikunova T.S., et al. Cytokine's genes and chronic lymphocytic leukemia. Moscow: RAMN; 2014: 132 (In Russian).

34. Watanabe T., Mitsuhashi M., Sagawa M., et al. Phytohemagglutinin-induced IL2 mRNA in whole blood can predict bortezomib-induced peripheral neuropathy for multiple myeloma patients. *Blood Cancer J.* 2013; 3: 150. DOI: 10.1038/bcj.2013.47

35. Isaza-Correa J.M., Liang Z., van den Berg A., et al. Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. *J. Hematol. Oncol.* 2014; 7: 57–67. DOI: 10.1186/s13045-014-0057-5

36. National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

37. Ellyard J.I., Simson L., Parish C.R. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens.* 2007; 70(1): 1–11. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2007.00869.x

Information about the authors

Elena L. Nazarova*, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biology Agency of Russia,

e-mail: nazarova@niigpk.ru;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9890-4264>

Natalia V. Minaeva, Cand. Sci. (Med.), Deputy Director for Clinical Work, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biology Agency of Russia,

e-mail: minaeva@niigpk.ru;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8479-3217>

Ekaterina N. Zotina, Cand. Sci. (Med.), Head of the Scientific and Clinical Department, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biology Agency of Russia,

e-mail: zotina@niigpk.ru;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9692-2541>

Докшина Ирина Анатольевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-клинического отдела ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»,
e-mail: dokshina@niigpk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1447-0199>

Сухорукова Эмилия Евгеньевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»,
e-mail: suhorukova@niigpk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8479-3217>

Шардаков Виктор Иванович, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»,
e-mail: shardakov@niigpk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6036-4250>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила 10.10.17

Принята к печати 24.12.2018

Irina A. Dokshina, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Scientific and Clinical Department, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biology Agency of Russia,
e-mail: dokshina@niigpk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1447-0199>

Emilia E. Sukhorukova, Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biology Agency of Russia,
e-mail: suhorukova@niigpk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8479-3217>

Viktor I. Shardakov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Leading Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biology Agency of Russia,
e-mail: shardakov@niigpk.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6036-4250>

*** Corresponding author**

Received 10 Oct 2017

Accepted 24 Dec 2018

ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ОРАЛЬНЫХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ

Галаяудинов Г. С.^{*}, Фейсханова Л. И., Абдуллаев Ш. П.

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
420012, Казань, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлен обзор клинических исследований, целью которого была демонстрация плеiotропных эффектов оральных антикоагулянтов. Плеiotропный эффект прямых антикоагулянтов обусловлен взаимодействием активированного фактора свертывания крови Ха и тромбина с протеаза-активированными рецепторами -1 и -2. Рассматривается связь оральных антикоагулянтов с развитием атеросклероза, с ангиогенезом, воспалением, ремоделированием сердца, онкогенезом, гломерулярной патологией. Прямые антикоагулянты обладают антиатеросклеротическим влиянием, а именно — ослабляют прогрессию и дестабилизацию атеросклеротического поражения, о чем свидетельствует снижение активности взаимодействия ДНК с нуклеарным фактором kB и белком-активатором-1 и другими медиаторами атеросклероза и воспаления. Эффекты новых пероральных антикоагулянтов отразились и на процессах ремоделирования сердца. Ингибиторы фактора Ха способствуют замедлению ремоделирования сердца путем уменьшения процессов воспаления и фиброза за счет уменьшения экспрессии рецепторов PAR в сердце. Оральные антикоагулянты оказывают противовоспалительное действие, о чем свидетельствует уменьшение экспрессии мРНК воспалительных цитокинов под влиянием прямых антикоагулянтов, в том числе на месте атеросклеротического поражения, и снижение продукции интерлейкина-6 под действием варфарина. Ингибиторы фактора Ха усиливают экспрессию факторов роста сосудов, стимулируют миграцию эндотелиальных клеток-предшественников и улучшают их функцию, что указывает на ангиогенный плеiotропный эффект. Варфарин также влияет на процессы ангиогенеза посредством уменьшения активации Akt тирозинкиназ и на гломерулярную патологию, пролиферацию мезангиальных клеток через путь Gas6/Axl. Противоопухолевая активность варфарина связана с ингибированием Gas6-опосредованной активации Axl на опухолевых клетках. Дальнейшее изучение плеiotропных эффектов оральных антикоагулянтов необходимо для полного понимания последствий влияния на гемостаз. Использована литературная база PubMed и SCOPUS.

Ключевые слова: атеросклероз, новые антикоагулянты, воспаление, плеiotропный эффект, фибрилляция предсердий, варфарин, обзор

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Галаяудинов Г.С., Фейсханова Л.И., Абдуллаев Ш.П. Плеiotропные эффекты оральных антикоагулянтов. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 90–98. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-90-98>

PLEIOTROPIC EFFECTS OF ORAL ANTICOAGULANTS

Galyautdinov G. S., Feiskhanova L. I., Abdullaev Sh. P.

Kazan State Medical University, 420012, Kazan, Russian Federation

ABSTRACT

In this paper, we present a literature review with the purpose of elucidating the pleiotropic effects of oral anticoagulants. The literature search was performed using the PubMed and SCOPUS databases. Pleiotropic effects of direct anticoagulants are determined by the interaction of Xa and thrombin IIa factors with PAR-1 and PAR-2 receptors. The focus of this review is the connection between oral anticoagulants and their effects on atherosclerosis, angiogenesis, inflammation, cardiac remodeling, oncogenesis and glomerular diseases. Direct anticoagulants exhibit an anti-atherosclerotic effect manifested in a decreased progression and destabilization of atherosclerotic lesions. This effect is confirmed by a decreased binding activity of DNA with NF- κ B and AP-1 transcription factors and reduced levels of some mediators. Such effects of new oral anticoagulants also relate to the processes of cardiac remodeling. FXa inhibitors contribute to the prevention of cardiac remodeling by reducing the processes of inflammation and fibrosis, which are associated with a decrease in the expression of PAR receptors in the heart. A number of studies also demonstrate an anti-inflammatory effect of oral anticoagulants, which is confirmed by reduced expression of mRNA inflammatory cytokines under the influence of direct anticoagulants and the production of IL-6 under the influence of warfarin. FXa inhibitors are shown to increase the expression of vascular growth factors, stimulate the migration of endothelial progenitor cells and improve their function, thus manifesting their angiogenic pleiotropic effect. In addition, warfarin has an impact both on angiogenesis by means of reducing the activation of Axl tyrosine kinases and on glomerular pathologies by means of affecting the proliferation of mesangial cells through the Gas6/Axl pathway. The antitumour activity of warfarin is associated with inhibition of Gas6-mediated activation of Axl on tumour cells. Further investigations are required to fully understand the effect of oral anticoagulants on haemostasis.

Keywords: atherosclerosis, new anticoagulants, inflammation, pleiotropic effect, atrial fibrillation, warfarin, review

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Galyautdinov G.S., Feiskhanova L.I., Abdullaev Sh.P. Pleiotropic effects of oral anticoagulants. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1):90–98 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-90-98>

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания в настоящее время вносят существенный вклад в общую структуру заболеваемости населения. Одной из наиболее частых причин смертности от сердечно-сосудистых заболеваний являются тромбоэмболические осложнения. Для их профилактики и лечения применяется антикоагулянтная терапия. Длительное время одним из основных препаратов антикоагулянтной терапии был антагонист витамина К — варфарин [1]. Этот

препарат был изучен вплоть до его влияния на гены [2]. Однако с появлением новых антикоагулянтов и их использованием в лечении и профилактике фибрилляции предсердий [3, 4], венозной тромбоэмболии [5], острого коронарного синдрома [6], инсульта [3] перспективными стали работы по изучению их плеiotропного эффекта, что особенно актуально в связи с интересом к развитию персонализированной медицины [7].

Плейотропные эффекты антикоагулянтов и пути их реализации

Плейотропностью (от греч. pleio — множественный и tropos — действие) препарата называют множественность его эффектов. Наряду с влиянием на гемостаз обнаруживаются иные свойства антикоагулянтов, основными из которых при использовании прямых антикоагулянтов, в частности варфарина, являются воздействие на ангиогенез, противовоспалительное [8–10], антиатеросклеротическое [8, 9], противоопухолевое [11, 12] действия, угнетение процессов ремоделирования предсердий [8, 9] и влияние на почки [13, 14]. В настоящее время изучен далеко не весь спектр плейотропных эффектов антикоагулянтов.

Активированный фактор Стюарта — Прауэра — фактор Ха (FXa) и тромбин (FIIa) являются основными мишенями при лечении больных прямыми пероральными антикоагулянтами. FXa представляет собой сериновую протеазу, играющую ключевую роль в каскаде реакций коагуляции крови, превращая протромбин в тромбин и способствуя образованию тромба. Кроме участия в коагуляционном каскаде FXa и тромбин играют большую роль в различных процессах, взаимодействуя с протеаза-активированными рецепторами (Protease-activated receptors — PAR) -1, -2 (PAR-1, -2). Эффект FXa зависит от количественной экспрессии этих рецепторов на клетках-мишенях. PAR-2 активируется непосредственным влиянием

FXa, тогда как PAR-1 — комплексом «тканевой фактор — FVIIa — FXa» [15–17]. PAR-1, -2 экспрессируются на многих клетках организма, вследствие этого влияние FXa охватывает эндотелиальные, эпителиальные, гладкомышечные клетки, лейкоциты, фибробласты и т. д. (рис. 1).

Всего известно четыре типа PAR (PAR-1–4), все они сопряжены с G-белком [18]. После активации рецепторов FXa инициируется гидролиз фосфатидилинозитола, который приводит к изменению содержания внутриклеточного кальция. FXa также инициирует фосфорилирование митоген-активированных протеинкиназ [8], что приводит к запуску различных транскрипционных программ. Эти программы способствуют росту и дифференцировке клеток, а также индукции генов, кодирующих цитокины (интерлейкин (ИЛ)-6, ИЛ-8, моноцитарный хемотаксический фактор-1, тканевой фактор, молекулы межклеточной адгезии-1) и белки внеклеточного матрикса (фактор роста соединительной ткани, коллаген, фибронектин). Сигнализация FXa высокоспецифична и зависит от типа клеток. FXa индуцирует пролиферацию фибробластов, гладкомышечных клеток сосудов или мезангиальных клеток почек, но не эндотелиальных клеток или лейкоцитов [16].

Первые эксперименты по исследованию негемостатических функций FXa, в которых проводилась делеция экспрессирующих FXa генов у подопытных животных,

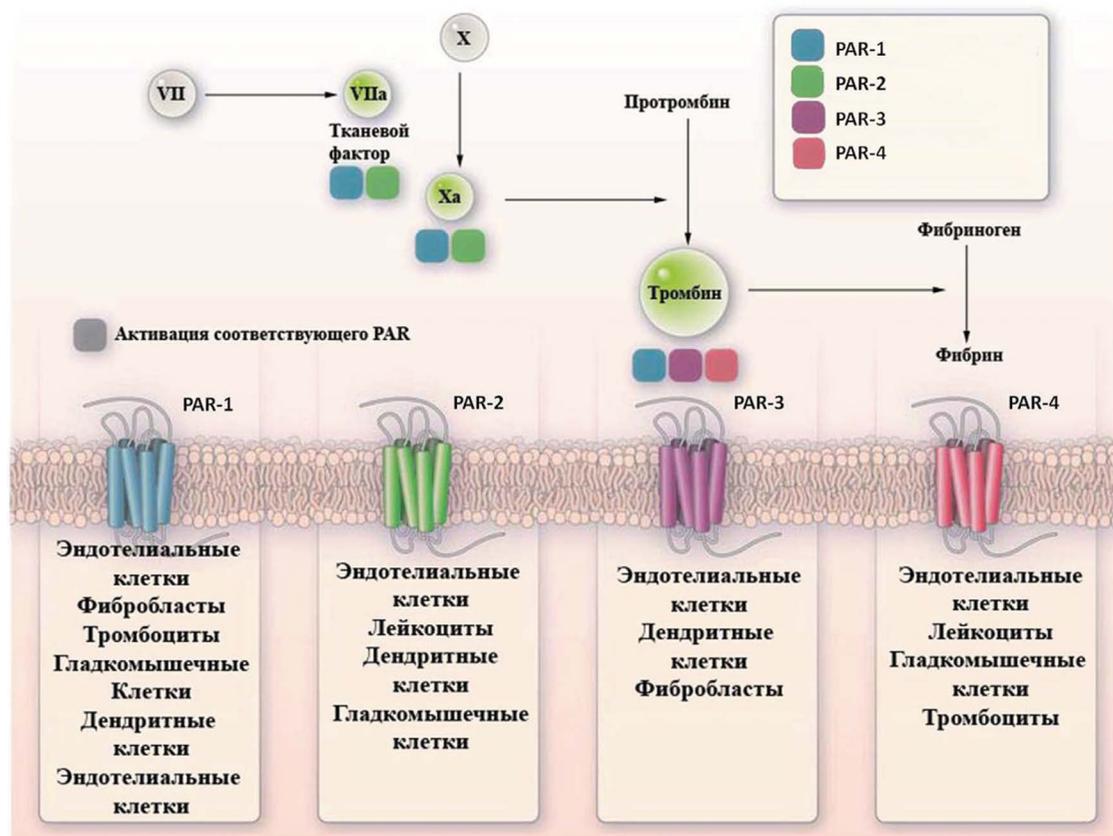


Рисунок 1. Схема активации различных типов PAR [60]

Figure 1. The scheme of activation of various PAR types [60]

приводили к их гибели при внутриутробном развитии либо сразу после рождения [19], что свидетельствовало не только о участии FXa в коагуляционном каскаде реакций, но и о его сигнальных функциях [17].

Однако плеiotропные эффекты наблюдались и у антикоагулянта раннего поколения — варфарина.

Варфарин блокирует K-зависимое γ -карбоксилирование глутаминовых кислот [20] и богатый γ -карбоксиглутаминовой кислотой домен growth arrest-specific 6 gene (*Gas6*), необходимый для индуцирования активности тирозинкиназы Axl [21].

Белок гена *Gas6* представляет собой протеин, имеющий последовательность аминокислот, на 46–48 % идентичную с белком S — сывороточным белком, который отрицательно воздействует на свертывание крови [22]. Однако биологическая функция белка гена *Gas6* оставалась неизвестной в течение нескольких лет, пока не было установлено, что данный белок является лигандом для рецепторов цитокинов Axl [23]. Axl представляет собой рецепторную тирозинкиназу с внеклеточными доменами, состоящими из двух доменов иммуноглобулина и двух доменов фибронектина типа III, который напоминает молекулы клеточной адгезии [24, 25]. Axl относится к семейству рецепторных тирозинкиназ TAM (Tyro3, Axl и Mer). Все три члена семьи имеют сходные структуры и имеют ряд лигандов, включая белок, кодируемый геном *Gas6*, и белок S. В тканях человека рецепторы тирозинкина-

зы TAM способствуют регуляции иммунного ответа, включая клиренс апоптотических клеток и ингибирование цитотоксической иммунной активации в ответ на апоптоз. Тирозинкиназные рецепторы TAM также участвуют в активации тромбоцитов и стабилизации сгустка крови [12].

Подобно белку S и другим K-зависимым белкам, таким как факторы свертывания, белок гена *Gas6* содержит кластер из 11–12 остатков глутаминовой кислоты на его N-конце, который посттрансляционно модифицируется γ -карбоксилазой в γ -карбоксиглутаматы в присутствии витамина K [12]. Эта модификация избирательно ингибируется варфарином [26].

Прямые антикоагулянты и атеросклероз

Ключевыми игроками процесса развития атеросклероза сосудистой стенки являются макрофагальные клетки [27]. FXa способствует экспрессии воспалительных молекул в клетках эндотелия сосудов, что ведет к вовлечению моноцитов/макрофагов в реакцию воспаления в сосудистой стенке (рис. 2). Именно эта реакция является триггером развития атеросклероза [28] и его прогрессии [15]. FX поддерживает прокоагулянтное состояние и воспаление сосудистой стенки при атеросклеротическом поражении [29] (рис. 3).

В основе антиатеросклеротического действия пероральных антикоагулянтов прямого действия лежит

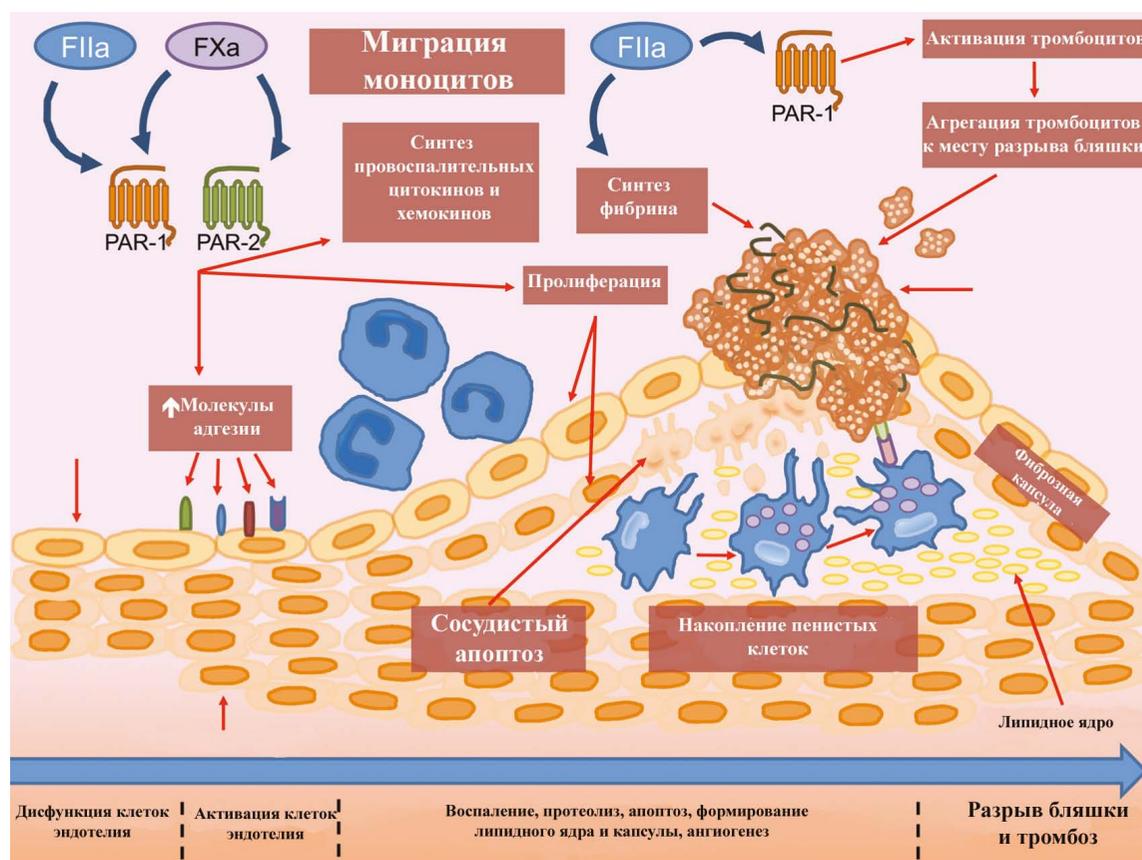


Рисунок 2. Патопфизиология атеротромбоза, роль FXa и тромбина [61]

Figure 2. Pathophysiology of atherothrombosis, the role of FXa and thrombin [61]

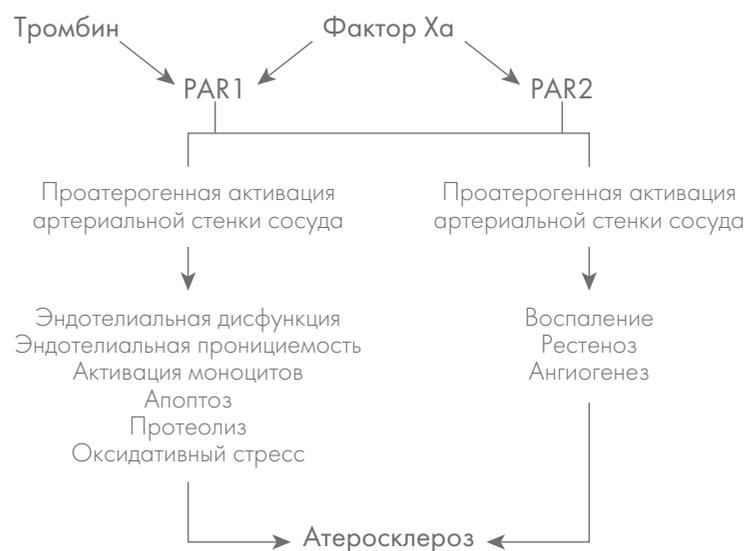


Рисунок 3. Участие PAR-1 и PAR-2 в развитии атеросклероза [62]
Figure 3. Participation of PAR-1 and PAR-2 in the development of atherosclerosis [62]

ремоделирование внеклеточного матрикса липидных бляшек [30]. Блокада взаимодействия FXa с PAR с целью уменьшения воспаления может стать новой мишенью при терапии атеросклеротических поражений сосудистой стенки.

Нара Т. и соавт. [31] в своем исследовании подтвердили антиатеросклеротическое действие ривароксабана — прямого ингибитора FXa. Малые дозы ривароксабана, при которых он не влияет на систему свертывания крови, оказывают атеропротективное действие.

Kadoglou N.P.E. и соавт. [32] исследовали влияние дабигатрана, ингибитора тромбина, на атеросклеротические поражения у мышей. Применение дабигатрана в течение 12 недель заметно уменьшало развитие атеросклероза. Стабилизация бляшки проявлялась в виде уменьшения площади атеросклеротического поражения, прочности капсулы, степени стеноза сосуда, содержания липидов внутри бляшки, а также количества макрофагов и воспалительных цитокинов, что косвенно свидетельствовало и об ослаблении воспалительной реакции.

Похожие результаты были получены и в исследовании Веа F. и соавт. [33]. Увеличение количества гладкомышечных клеток, образование более толстых фиброзных колпачков, замедление эрозии, обнаруженные при длительном применении мелагатрана, демонстрируют стабилизирующий эффект ингибирования FXa. Мелагатран снижает активность связывания ДНК с нуклеарным фактором kB (nuclear factor kB — NF-kB) и белком-активатором-1 (Activator protein — AP-1) и таким образом приводит к снижению синтеза матриксной металлопротеиназы-9, что обуславливает вышеперечисленные эффекты. NF-kB и AP-1 являются важными регуляторами транскрипции матриксной металлопротеиназы-9 [34].

Zhou Q. и соавт. [35] выявили у мышей утолщения фиброзной покрышки, уменьшение количества эрозий атеросклеротических бляшек в результате длительной терапии ривароксабаном.

Вышеприведенные исследования прямых пероральных антикоагулянтов были проведены на животных и требуют дальнейшего клинического изучения.

KatoH H. и соавт. [36] изучили плеiotропные эффекты ингибиторов FXa у больных с фибрилляцией предсердий. Об антиатеросклеротическом и противовоспалительном действиях ингибиторов FXa свидетельствовало снижение концентраций таких медиаторов, как пентраксинзависимый протеин-3, D-димер, тромбомодулин, ИЛ-6 в крови.

Таким образом, новые антикоагулянты прямого действия способны ослаблять прогрессию и дестабилизацию атеросклеротического поражения.

Прямые антикоагулянты и ремоделирование сердца

Фибрилляция предсердий нередко сопровождается ремоделированием предсердий, которое характеризуется их увеличением, гипертрофией кардиомиоцитов и развитием периваскулярного фиброза. Этот вид аритмии часто наблюдается у больных, страдающих синдромом ночного апноэ. Гипоксия, которая наблюдается при ночном апноэ, в свою очередь, также способствует ремоделированию сердца с развитием как систолической, так и диастолической дисфункции, возникающей вследствие повышения экспрессии PAR-1,2 и NF-kB в предсердиях [37–39].

Плеiotропный эффект новых пероральных антикоагулянтов относится и к процессам ремоделирования сердца. В работе Azuma M. и соавт. [38] отмечается, что терапия ривароксабаном влияет на экспрессию мРНК PAR-1, -2, внеклеточной сигналирующей киназы, NF-kB и на дегенерацию мелких артерий.

В другом исследовании Mitsuishi R. и соавт. [39] использовался иной подход, при котором воздействовали ривароксабаном на оба рецептора, а также дискретно антагонистом PAR-1 и антагонистом PAR-2. Во всех трех группах отмечалось предотвращение процессов ремоделирования миокарда предсердий. В группе с антагонистом PAR-1 наблюдался наиболее значительный эффект, что свидетельствует о немаловажной роли PAR-1 в процессе ремоделирования предсердий.

PAR-2, активируемые тромбином, вносят вклад в патогенез развития хронической сердечной недостаточности и гипертрофии стенок сердца [40]. Активация PAR-2 индуцирует гипертрофический рост кардиомиоцитов и увеличивает экспрессию моноцитарного хемотаксического фактора-1. В свою очередь, дефицит PAR-2 ослабляет процессы ремоделирования сердца и улучшает его функцию после ишемического события [40].

Goto M. и соавт. [41] оценивали вторичную профилактику сердечно-сосудистых осложнений после ишемии миокарда у мышей. В исследовании участвовали группы животных, которые получали высокие или низкие дозы ривароксабана. В обеих исследуемых группах наблюдалось снижение экспрессий мРНК ИЛ-6 и мРНК фиброзных факторов, включая коллагены 1a2 и 3a1. Таким образом, ингибиторы FXa препятствуют быстрой прогрессии ремоделирования сердца путем ослабления процессов воспаления и фиброза, связанного со снижением экспрессии PAR в сердце независимо от его антикоагулянтного эффекта.

Антикоагулянты и ангиогенез

Рост и восстановление сосудов зависят от многих факторов. Одним из них является пролиферация эндотелиальных клеток-предшественников, известных как предикторы эндотелиального восстановления. Ингибиторы FXa усиливают экспрессию факторов роста сосудов, стимулируют миграцию клеток-предшественников и улучшают их функцию, что указывает на их ангиогенный плеiotропный эффект [42].

Wu T.C. и соавт. [43] доказали, что ривароксабан усиливает экспрессию фактора роста эндотелия сосудов и эндотелиальной синтазы оксида азота, улучшает функцию клеток-предшественников на модели экспериментально индуцированного диабета у животных.

FXa способен ингибировать ангиогенез посредством воздействия на PAR-1 [44, 45]. Yavuz C. и соавт. [46] подтвердили, что ривароксабан дозозависимо оказывает влияние на ангиогенез.

Axl также экспрессируется на эндотелиальных клетках сосудов и играет роль в ангиогенезе [47]. Варфарин, в свою очередь, также влияет на процессы ангиогенеза посредством уменьшения активации Axl тирозинкиназ. Axl является ключевым регулятором многих патологических ангиогенных процессов, таких как миграция и пролиферация эндотелиальных клеток, образование сосудов. Ингибирование Axl изменяет ангиогенный баланс, приводя эндотелиальные клетки в более спокойное, стабильное, дифференцированное состояние [12].

Антикоагулянты и воспаление

Воспаление имеет особое значение в развитии атеросклеротического поражения. Признаки локального неспецифического воспалительного процесса при атеросклерозе прослеживаются с самых ранних стадий поражения стенки сосуда и до момента дестабилизации и повреждения атеросклеротической бляшки [48]. Атеросклероз связан не только с образованием и прогрессированием атеросклеротических бляшек, но также считается системным воспалительным заболеванием, которое модулируется генетическими и экологическими факторами риска. Длительное воспаление атеросклеротического поражения способ-

ствует разрыву бляшки и образованию тромба, который участвует в развитии ишемии и последующего инфаркта миокарда [30, 49]. Было установлено, что FXa вызывает острые воспалительные реакции *in vivo* [50] и *in vitro* [51–53]. FXa активирует тромбин, который участвует в воспалительных процессах, образуя комплексы с тромбомодулином и активированным протеином С, которые уменьшают адгезию лейкоцитов, инфильтрацию эндотелия сосудов моноцитами и вызывают высвобождение цитокинов [54].

В инициации процесса атеросклероза большое значение имеют такие медиаторы воспаления, как моноцитарный хемотаксический фактор-1, фактор некроза опухолей- α (ФНО- α), ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 [55]. Коагуляция тесно связана с воспалительными сигнальными путями. Показано, что антикоагулянтное лечение не только уменьшает активацию коагуляции, но также ингибирует воспаление, указывая на общность этих процессов [56].

В работе Zhou Q. и соавт. [35] отмечено уменьшение прогрессирования атеросклеротической бляшки за счет снижения воспаления у мышей, получавших ривароксабан. Долгосрочное применение ривароксабана значительно уменьшало экспрессию мРНК ИЛ-6, ФНО- α и моноцитарного хемотаксического фактора-1, что демонстрирует противовоспалительные свойства ингибитора FXa. Однако в исследовании Naga T. и соавт. [31] было отмечено, что только в группе мышей, получавших низкую дозу ривароксабана, наблюдался значительный противовоспалительный эффект.

Terry C.M. и соавт. [57] также наблюдали снижение концентрации воспалительного медиатора, моноцитарного хемотаксического фактора-1, в крови исследованных мышей.

Варфарин также играет роль в регуляции взаимодействующих цитокинов, таких как ИЛ-6 и циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2). Эти цитокины являются взаимодействующими, потому что внутриклеточный механизм действия ЦОГ-2 стимулирует транскрипцию гена, кодирующего ИЛ-6 [58].

В исследовании Shafiq и соавт. [10] была отмечена корреляция концентраций ИЛ-6 и ЦОГ-2 у больных, принимавших варфарин. Концентрации ИЛ-6 и ЦОГ-2 значительно снижались при низкой дозе препарата и заметно увеличивались при высокой дозе. На основании результатов исследования можно сказать, что варфарин оказывает противовоспалительное действие, уменьшая экспрессию ЦОГ-2, что ведет к снижению продукции ИЛ-6.

Таким образом, прямые ингибиторы FXa обладают не только антикоагулянтным, но и противовоспалительным эффектом.

Варфарин и опухолевый рост

Экспрессия и активность Axl имеют решающее значение для выживаемости, эпителиально-мезенхималь-

ного перехода, метастатического потенциала многих типов злокачественных клеток [11].

Противоопухолевая активность варфарина связана с ингибированием *Gas6*-опосредованной активации *Axl* на опухолевых клетках. Варфарин ингибирует активацию *Axl*, опосредованную *Gas6*, в концентрациях, при которых препарат не влияет на процессы свертывания крови. Нарушается передача сигнала *Gas6*-*Axl*, требуемая для жизнедеятельности опухолевой клетки. Также ингибирование передачи сигналов *Axl* связано с потерей признака злокачественной опухолевой клетки — метастазирования [12].

Варфарин и гломерулярная патология

Yanagita M. и соавт. [14] продемонстрировали, что белок гена *Gas6* является аутокринным фактором роста для мезангиальных клеток и то, что варфарин ингибирует пролиферацию мезангиальных клеток путем уменьшения продукции белка гена *Gas6*, препятствуя К-витамин-зависимому γ -карбоксилированию его домена Gla. Антипролиферативный эффект варфарина был достигнут при концентрациях ниже терапевтических.

В другом исследовании Yanagita M. и соавт. [13] показали, что путь *Gas6*/*Axl* играет ключевую роль в пролиферации мезангиальных клеток.

Литература / References

1. Jones M., McEwan P., Morgan C.L., et al. Evaluation of the pattern of treatment, level of anticoagulation control, and outcome of treatment with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation: a record linkage study in a large British population. *Heart*. 2005; 91: 472–77. DOI: dx.doi.org/10.1136/hrt.2004.042465
2. Takeuchi F., McGinnis R., Bourgeois S., et al. A Genome-Wide Association Study Confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as Principal Genetic Determinants of Warfarin Dose. *PLoS Genet*. 2009; 5(3): 100–33. DOI: doi.org/10.1371/journal.pgen.1000433
3. Hankey G.J., Patel M.R., Stevens S.R., et al. Rivaroxaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a subgroup analysis of ROCKET AF. *The Lancet Neurology*. 2012; 11: 315–22. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70042-X
4. Connolly S.J., Ezekowitz M.D., Phil D., et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2009; 361: 1139–51. DOI: 10.1056/NEJMoa0905561
5. Schulman S., Kearon C., Kakkar A.K., et al. Extended Use of Dabigatran, Warfarin, or Placebo in Venous Thromboembolism. *N Engl J Med*. 2013; 368: 709–18. DOI: 10.1056/NEJMoa1113697
6. Mega J.L., Braunwald E., Wiviott S.D., et al. Rivaroxaban in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2012; 366: 9–19. DOI: 10.1056/NEJMoa1112277
7. Gillis A.M., Krahn A.D., Skanes A.C., Nattel S. Management of Atrial Fibrillation in the Year 2033: New Concepts, Tools, and Applications Leading to Personalized Medicine; *Can. J Cardiol*. 2013; 29: 1141–6. DOI: 10.1016/j.cjca.2013.07.006
8. Papadaki S., Tselepis A.D. Non-haemostatic functions of Factor Xa: Are there pleiotropic effects of the direct oral anti-Xa anticoagulants? *Hellenic Journal of Atherosclerosis*. 2015; 6(3): 168–79. DOI: 10.23803/hja.v6i3.12
9. Spronk H.M.H., de Jong A.M., Crijns H.J., et al. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovascular Research*. 2014; 101: 344–51. DOI: 10.1093/cvr/cvt343
10. Shafiq H., Rashid A., Majeed A. Effects of different warfarin doses on IL-6 and COX-2 levels. *Pak Armed Forces Med J*. 2016; 66(5): 673–75.
11. Levin P.A., Brekken R.A., Byers L.A., et al. Axl receptor axis: a new therapeutic target in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016; 11(8): 1357–62. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.04.015
12. Kirane A., Ludwig K.F., Sorrelle N., et al. Warfarin blocks *Gas6*-mediated *Axl* activation required for pancreatic cancer epithelial plasticity and metastasis; *Cancer Res*. 2015; 75(18): 3699–705. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2887-T
13. Yanagita M., Arai H., Ishii K., et al. *Gas6* regulates mesangial cell proliferation through *Axl* in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2001; 158: 1423–32. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64093-X
14. Yanagita M., Ishii K., Ozaki H., et al. Mechanism of inhibitory effect of warfarin on mesangial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 2503–9.
15. Esmon C.T. Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thromb Haemost*. 2014. 111: 625–33. DOI: 10.1160/TH13-09-0730
16. Borensztajn K., Peppelenbosch M.P., Spek C.A. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med*. 2008; 14: 429–40. DOI: 10.1016/j.molmed.2008.08.001
17. Fan Y., Zhang W., Mulholland M. Thrombin and PAR-1-AP Increase Proinflammatory Cytokine Expression in C6 Cells. *J Surg Res*. 2005; 129: 196–201. DOI: 10.1016/j.jss.2005.07.041
18. Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(20): 9208–12.
19. Rosen E.D. Gene targeting in hemostasis. Factor X. *Frontiers Bioscience: A J Virtual Library*. 2002; 7: 1915–25.

20. Nakano T., Kawamoto K., Kishino J., et al. Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J.* 1997; 323: 387–92.
21. Varnum B.C., Young C., Elliott G., et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature.* 1995; 373: 623–6. DOI: 10.1038/373623a0
22. Manfioletti G., Brancolini C., Avanzi G., Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 4976–85. DOI: 10.1128/MCB.13.8.4976
23. Stitt T.N., Conn G., Gore M., et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell.* 1995; 80: 661–70. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90520-0
24. O'Bryan J.P., Frye R.A., Cogswell P.C., et al. Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 1991; 11: 5016–31. DOI: 10.1128/MCB.11.10.5016
25. Janssen J.W., Schulz A.S., Steenvoorden A.C., et al. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene.* 1991; 6(11): 2113–20.
26. Suttie J.W. Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54: 459–77. DOI: 10.1146/annurev.bi.54.070185.002331
27. Boyle J.J. Macrophage Activation in Atherosclerosis: Pathogenesis and Pharmacology of Plaque Rupture. *Current Vascular Pharmacology.* 2005; 3: 63–8. DOI: 10.2174/1570161052773861
28. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1685–95. DOI: 10.1056/NEJMr043430
29. Giesen P.L., Rauch U., Bohmann B., et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(5): 2311–5.
30. Lee I.O., Kratz M.T., Schirmer S.H., et al. The Effects of Direct Thrombin Inhibition with Dabigatran on Plaque Formation and Endothelial Function in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J. Pharmacol Exp Ther.* 2012; 343(2): 253–7. DOI: 10.1124/jpet.112.194837
31. Hara T., Fukuda D., Tanaka K., et al. Rivaroxaban, A Novel Oral Anticoagulant, Attenuates Plaque Progression in ApoE-Deficient Mice Through the Inhibition of Pro-Inflammatory Activation of Macrophages. *Am Heart Assoc, Circulation.* 2015; 242: 639–46. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.023
32. Kadoglou N.P.E., Moustardas P., Katsimpoulas M., et al. The Beneficial Effects of a Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran Etxilate, on the Development and Stability of Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012; 26: 367–74. DOI: 10.1007/s10557-012-6411-3
33. Bea F., Kreuzer J., Preusch M., et al. Melagatran Reduces Advanced Atherosclerotic Lesion Size and May Promote Plaque Stability in Apolipoprotein E- Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2787–92. DOI: 10.1161/01.ATV.0000246797.05781
34. Turner N.A., O'Regan D.J., Ball S.G., Porter K.E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels. *FASEB J.* 2005; 19(4): 804–6. DOI: 10.1096/fj.04-2852fje
35. Zhou Q., Bea F., Preusch M., et al. Evaluation of Plaque Stability of Advanced Atherosclerotic Lesions in Apo E-Deficient Mice after Treatment with the Oral Factor Xa Inhibitor Rivaroxaban. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation.* 2011; 2011: 9. DOI: 10.1155/2011/432080
36. Katoh H., Nozue T., Michishita I. Anti-inflammatory effect of factor-Xa inhibitors in Japanese patients with atrial fibrillation. *Heart and Vessels.* 2017; 32: 1130–6. DOI: 10.1007/s00380-017-0962-y
37. Dimitri H., Ng M., Brooks A.G., Kuklik P., et al. Atrial remodeling in obstructive sleep apnea: Implications for atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2012; 9: 321–7. DOI: 10.1016/j.hrthm.2011.10.017
38. Azuma M., Yoshimura F., Tanikawa S., et al. Factor XA Inhibition by Rivaroxaban Attenuates Cardiac Remodeling Due To Hypoxic Stress VIA PAR-2/ERK/NF-κB Signaling Pathway. *JACC.* 2016; 67: 2238. DOI: 10.1016/S0735-1097(16)32239-2
39. Mitsuishi R., Imano H., Kato R., et al. Rivaroxaban Attenuates Cardiac Remodeling Due To Intermittent Hypoxia By Suppressing The Synergistic Effects Of PAR-1 And PAR-2. *JACC.* 2017; 69: 2033. DOI: 10.1016/S0735-1097(17)35422-0
40. Antoniuk S., Sparkenbaugh E.M., Tencati M., et al. Protease activated receptor-2 contributes to heart failure. *PLoS One.* 2013; 8(11): 81733. DOI: 10.1371/journal.pone.0081733
41. Goto M., Miura S.I., Suematsu Y., et al. Rivaroxaban, a factor Xa inhibitor, induces the secondary prevention of cardiovascular events after myocardial ischemia reperfusion injury in mice. *Int J Cardiol.* 2016; 220: 602–7. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.06.212
42. Maruyama K., Asai J., Li M., et al. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol.* 2007; 170: 1178–91. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060018
43. Wu T.C., Chan J.S., Lee C.Y., et al. Rivaroxaban, a factor Xa inhibitor, improves neovascularization in the ischemic hindlimb of streptozotocin-induced diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology.* 2015; 14: 81. DOI: 10.1186/s12933-015-0243-y
44. Lange S., Gonzalez I., Pinto M.P., et al. Independent anti-angiogenic capacities of coagulation factors X and Xa. *J Cell Physiol;* 2014; 229: 1673–80. DOI: 10.1002/jcp.24612
45. Herbert J., Bono F., Herault J., et al. Effector protease receptor 1 mediates the mitogenic activity of factor Xa for vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1998; 101(5): 993–1000. DOI: 10.1172/JCI1833
46. Yavuz C., Caliskan A., Karahan O., et al. Investigation of the antiangiogenic behaviors of rivaroxaban and low molecular weight heparins. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014; 25: 303–8. DOI: 10.1097/MBC.000000000000019
47. Holland S.J., Powell M.J., Franci C., et al. Multiple Roles for the Receptor Tyrosine Kinase Axl in Tumor Formation. *Cancer Res.* 2005; 65(20): 9294–303. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0993
48. Maseri A., Cianflone D. Inflammation in acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2002; 4: 8–13. DOI: 10.1016/S1520-765X(02)90009-X
49. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Am Heart Assoc Circulation.* 2001; 104: 365–72. DOI: 10.1161/01.CIR.104.3.365
50. Cirino G., Cicala C., Bucci M., et al. Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation: Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *J Clin Invest.* 1997; 99(10): 2446–51. DOI: 10.1172/JCI119428
51. Ruf W., Dorffleutner A., Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2003; 1: 1495–503. DOI: 10.1046/j.1538-7836.2003.00300.x
52. Hezi-Yamit A., Wong P.W., Bien-Ly N., et al. Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF: evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005; 102(34): 12077–82. DOI: 10.1073/pnas.0504526102
53. Daubie V., Cauwenberghs S., Senden N.M.H., et al. Factor Xa and thrombin evoke additive calcium and proinflammatory responses in endothelial cells subjected to coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research.*

- 2006; 1763: 860–9. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.04.010
54. Stephenson D.A., Tolil L.J., Beaudin S., Liaw P.C. Modulation of monocyte function by activated protein c, a natural anticoagulant. *J Immunol.* 2006; 177(4): 2115–22. DOI: 10.4049/jimmunol.177.4.2115
55. Packard R.R.S., Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical Chemistry.* 2008; 54(1): 24–38. DOI: 10.1373/clinchem.2007.097360
56. Dorffler-Melly J., Schwarte L.A., Ince C., Levi M. Mouse models of focal arterial and venous thrombosis. *Basic Research in Cardiology.* 2000; 95: 503–9.
57. Terry C.M., He Y., Cheung A.K. Rivaroxaban improves patency and decreases inflammation in a mouse model of catheter thrombosis. *Thrombosis Research.* 2016; 114: 106–12. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.06.008
58. Moon Y., Pestka J.J. Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation

- by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003; 187(2): 80–8. DOI: 10.1016/S0041-008X(02)00033-9
59. Nagai K., Arai H., Yanagita M., et al. Growth arrest-specific gene δ is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J Biol Chem.* 2003; 278: 18229–34. DOI: 10.1074/jbc.M213266200
60. Borisoff J.I., Spronk H.M.H., ten Cat H. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1746–1760. DOI: 10.1056/NEJMra1011670
61. Esmon C.T. Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *J Thromb Haemost.* 2014; 111: 625–33. DOI: 10.1160/TH13-09-0730
62. Spronk H.M.H., de Jong A.M., Crijns H.J., et al. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovascular Research.* 2014; 101: 344–51. DOI: 10.1093/cvr/cvt343

Информация об авторах

Галютдинов Геншат Саляхутдинович*, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: galgen077@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7403-0200>

Фейсханова Люция Исхаковна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Абдуллаев Шохрух Пардабойевич, студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

* Автор, ответственный за переписку

Поступила 15.05.2018

Принята к печати 24.12.2018

Information about authors

Genshat S. Galyautdinov*, Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Hospital therapy, Kazan State Medical University, e-mail: galgen077@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7403-0200>

Feiskhanova Lucia Iskhakovna, Cand. Sci. (Med.), Assistant Prof., Department of Hospital therapy, Kazan State Medical University.

Abdullaev Shokhrukh Pardaboevich, Student, Kazan State Medical University.

* Corresponding author

Received 15 May 2018

Accepted 24 Dec 2018

ISSN 0234-5730



9 770234 573007