

ГЕМАТОЛОГИЯ и ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ

1' 2016

КВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1956 ГОДА

ЯНВАРЬ—МАРТ ТОМ 61

Учредитель журнала ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС РЕДАКЦИИ:

115088, Москва,
ул. Новоослаповская, д. 5, стр. 14
ОАО «Издательство "Медицина"»

ТЕЛЕФОН РЕДАКЦИИ:

+7-495-670-65-94

E-mail: RBelGT@yandex.ru

Зав. редакцией *М. Ю. Белоусова*

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел./факс +7-495-678-64-84

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели

Редактор *И. Я. Таджиев*

Художественный редактор
М. Б. Белякова

Корректор *В. С. Смирнова*

Верстка *С. М. Мешкорудникова*

Сдано в набор 18.02.16.

Подписано в печать 16.03.16.

Формат 60 x 88 1/8.

Печать офсетная.

Печ. л. 7,00.

Усл. печ. л. 7,35.

Уч.-изд. л. 8,01.

Заказ 25.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР № 010215 от 29.04.97 г.

Журнал зарегистрирован
в Роскомнадзоре РФ.

Свидетельство о регистрации

ПИ № ФС 77-36821 от 14 июля 2009 г.

Отпечатано в типографии

ООО "Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

Каталог АО "Роспечать":

Индекс 71426

Объединенный каталог "Пресса России":

Индекс 41284

Подписка через интернет:

www.akc.ru, www.pressa-ru

Подписка

на электронную версию журнала:

elibrary.ru

ISSN 0234-5730 (Print).

ISSN 2411-3042 (Online). Гематология и
трансфузиология. 2015. Т. 60. № 4, 1–56.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор журнала

ВОРОБЬЕВ Андрей Иванович, академик РАН,
доктор мед. наук, профессор

Заместитель главного редактора

ГОРОДЕЦКИЙ Владимир Матвеевич, член-корр. РАН,
доктор мед. наук, профессор

Ответственный секретарь (трансфузиология), научный редактор

ГАЛСТЯН Геннадий Мартинович, доктор мед. наук

Ответственный секретарь (гематология)

ТРОИЦКАЯ Вера Витальевна, кандидат мед. наук

ЧЛЕНЫ РЕДКОЛЛЕГИИ:

Бирюкова Людмила Семеновна, доктор мед. наук
Васильев Сергей Александрович, доктор мед. наук, профессор
Воробьев Иван Андреевич, член-корр. РАН, доктор биол.
наук, профессор
Голеньков Анатолий Константинович, доктор мед. наук,
профессор
Головкина Лариса Леонидовна, доктор мед. наук
Домрачева Елена Васильевна, доктор мед. наук, профессор
Донсков Сергей Иванович, доктор мед. наук, профессор
Козинец Геннадий Иванович, доктор мед. наук, профессор
Мамонов Василий Евгеньевич, кандидат мед. наук
Масчан Алексей Александрович, доктор мед. наук, профессор
Османов Евгений Александрович, доктор мед. наук, профессор
Паровичникова Елена Николаевна, доктор мед. наук
Рагимов Гейдар Алекперович, доктор мед. наук, профессор
Савченко Валерий Григорьевич, академик РАН, доктор мед.
наук, профессор
Судариков Андрей Борисович, доктор биол. наук
Тупицын Николай Николаевич, доктор мед. наук, профессор
Франк Георгий Авраамович, член-корр. РАН, доктор мед. наук,
профессор
Хватов Валерий Борисович, доктор мед. наук, профессор
Хорошко Нина Дмитриевна, доктор мед. наук, профессор
Чернов Вениамин Михайлович, доктор мед. наук, профессор

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Абдулкадыров Кудрат Мугутдинович (Санкт-Петербург, Россия), Афанасьев
Борис Владимирович (Санкт-Петербург, Россия), Берковский Арон
Ленидович (Москва, Россия), Дризе Нина Иосифовна (Москва, Россия),
Карякин Александр Вадимович (Москва, Россия), Калинин Николай
Николаевич (Москва, Россия), Ковалева Лидия Григорьевна (Москва,
Россия), Криволапов Юрий Александрович (Санкт-Петербург, Россия),
Лукина Елена Алексеевна (Москва, Россия), Менделеева Лариса Павловна
(Москва, Россия), Мисюрин Андрей Витальевич (Москва, Россия), Никитин
Иван Куприянович (Москва, Россия), Поспелова Татьяна Ивановна
(Новосибирск, Россия), Рукавицын Олег Анатольевич (Москва, Россия),
Сахибов Яшен Даминович (Москва, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

Бахрамов Саиджаол Махмудович (Ташкент, Республика Узбекистан),
Идельсон Лев Иосифович (Иерусалим, Израиль), Новак Василий Леонидович
(Львов, Украина), Перехрестенко Петр Михайлович (Киев, Украина)



GEMATOLOGIYA i TRANSFUZIOLOGIYA

1' 2016

FREQUENCY 4 ISSUES PER YEAR

HEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

FOUNDED IN 1956

JANUARY—MARCH VOL. 61

Founder of the Journal National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief Vorobiev Andrey I., academician of Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor

Deputy Editor

Gorodetsky Vladimir M., corresponding member of Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor

Executive Editor of Transfusiology

Scientific Editor

Galstyan Gennady M., MD, PhD, DSc

Executive Editor of Haematology

Troitskaya Vera V., MD, PhD

Editorial Board:

Biryukova Ludmila S., MD, PhD, DSc; Vasiliev Sergey A., MD, PhD, DSc, prof.; Vorobiev Ivan A., corresponding member of Russian Academy of Natural Sciences, BD, PhD, DSc, prof.; Golenkov Anatoliy K., MD, PhD, DSc, prof.; Golovkina Larisa L., MD, PhD, DSc; Domracheva Elena V., MD, PhD, DSc, prof.; Donskov Sergey I., MD, PhD, DSc, prof.; Kozinets Gennady I., MD, PhD, DSc, prof.; Mamonov Basil E., MD, PhD; Maschan Alexey A., MD, PhD, DSc, prof.; Osmanov Eugeniy A., MD, PhD, DSc, prof.; Parovichnikova Elena N., MD, PhD, DSc; Rahimov Heydar A., MD, PhD, DSc, prof.; Savchenko Valeriy G., academician Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, prof.; Sudarikov Andrey B., BD, PhD, DSc; Tupitsin Nicholay N., MD, PhD, DSc, prof.; Frank George A., corresponding member of Russian Academy of Medical Sciences, MD, PhD, DSc, prof.; Hvatov Valeriy B., MD, PhD, DSc, prof.; Khoroshko Nina D., MD, PhD, DSc, prof.; Chernov Benyamin M., MD, PhD, DSc, prof.

Advisory Board

Abdulkadyrov Kudrat M. (St. Petersburg, Russia), Afanasyev Boris V. (St. Petersburg, Russia), Berkovskiy Aron L. (Moscow, Russia), Drize Nina I. (Moscow, Russia), Karyakin Alexander V. (Moscow, Russia), Kalinin Nikolay N. (Moscow, Russia), Kovaleva Lydia G. (Moscow, Russia), Krivolapov Yuri A. (Saint-Petersburg, Russia), Lukina Elena A. (Moscow, Russia), Mendeleeva Larisa P. (Moscow, Russian), Misyurin Andrey V. (Moscow, Russia), Nikitin Ivan K. (Moscow, Russia), Pospelova Tatiana I. (Novosibirsk, Russia), Rukavitsyn Oleg A. (Moscow, Russia), Sakhibov Yashen D. (Moscow, Russia)

International Advisory Board

Bakhramov Saidzhalol M. (Tashkent, Uzbekistan), Idelson Lev I. (Ierusalim, Israel), Novak Vasily L. (Lviv, Ukraine), Perehrestenko Peter M. (Kiev, Ukraine)

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ORIGINAL PAPERS

- Фоминых М.С., Абдулкадыров К.М., Туркина А.Г., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Цаур Г.А., Бедерак Н.В., Чельшишева Е.Ю., Шухов О.А., Абдуллаев А.О., Удалева В.Ю., Зотова И.И., Шихбабаева Д.И., Полушкина Л.Б., Иванова М.П., Петрова Е.В., Мартыненко Л.С., Клейна Е.В., Цыбакова Н.Ю. Персонализация терапии хронического миелолейкоза – прогностическое значение индивидуальной динамики уровня BCR-ABL..... 4-10
- Нарейко М.В., Менделеева Л.П., Сурин В.Л., Демидова Е.Ю., Покровская О.С., Кузьмина Л.А., Грибанова Е.О., Гальцева И.В., Урнова Е.С., Дроков М.Ю., Фирсова М.В., Соловьев М.В., Макунина Э.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Эффективность индукционной терапии у первичных больных множественной миеломой в зависимости от уровня экспрессии гена c-MYC в дебюте заболевания..... 10-16
- Ионова Т.И., Анчукова Л.В., Виноградова О.Ю., Гриценко Т.А., Евсеев А.В., Козлова Л.К., Курбатова К.А., Кучма Г.Б., Ломаиа Е.Г., Лямкина А.С., Мачулайтене Е.Р., Мясников А.А., Никитина Т.П., Панкрашкина М.М., Поспелова Т.И., Родионова А.Ю., Усачева Е.И. Качество жизни и спектр симптомов у больных миелофиброзом на фоне терапии: данные клинической практики..... 17-25
- Клясова Г.А., Коробова А. Г., Фролова И.Н., Охмат В.А., Куликов С.М., Паровичникова Е.Н., Кравченко С.К. Детекция энтеробактерий с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра у больных острыми миелоидными лейкозами и лимфомами при поступлении в стационар..... 25-32
- Дроков М.Ю., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г. Роль транскрипта B в популяции T-регуляторных клеток у больных после трансплантации аллогенного костного мозга..... 32-37
- Тихомиров Д.С., [Гаранжа Т.А.], Туполева Т.А., Троицкая В.В., Галстян Г.М., Филатов Ф.П. Факторы, влияющие на частоту возникновения вирусных пневмоний у онкогематологических больных..... 37-42
- Сметанина Н.С., Терещенко Г.В., Красильникова М.В., Гвоздев А.А., Ибрагимова Д.И., Митрофанова А.М., Лохматова М.Е., Новичкова Г.А. Оценка степени накопления железа у детей с трансфузионнозависимой β-талассемией..... 42-48
- Андреева Т.А., Лавриченко И.А., Климова Н.И., Залепухина О.Э., Константинова В.Н., Ким А.В. Особенности ведения пациентов с болезнью Виллебранда: опыт Санкт-Петербургского Городского центра по лечению гемофилии..... 49-53
- Фоминых М.С., Абдулкадыров К.М., Туркина А.Г., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Цаур Г.А., Бедерак Н.В., Чельшишева Е.Ю., Шухов О.А., Абдуллаев А.О., Удалева В.Ю., Зотова И.И., Шихбабаева Д.И., Полушкина Л.Б., Иванова М.П., Петрова Е.В., Мартыненко Л.С., Клейна Е.В., Цыбакова Н.Ю. Personalization of chronic myelogenous leukemia treatment – prognostic value of the individual rate of BCR-ABL decline
- Nareiko M.V., Mendeleeva L.P., Surin V.L., Demidova E.Yu., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A., Gribanova E.O., Galtseva I.V., Urnova E.S., Drokov M.Yu., Firsova M.V., Soloviev M.V., Makunina E.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Efficacy of induction therapy in patients with de novo diagnosed multiple myeloma depends on c-MYC gene expression at the debut of disease
- Ionova T.I., Anchukova L.V., Vinogradova O.Yu., Gritsenko T.A., Evseev A.V., Kozlova L.K., Kurbatova K.A., Kuchma G.B., Lomaia E.G., Lyamkina A.S., Machulaytene E.P., Myasnikov A.A., Nikitina T.P., Pankrashkina M.M., Pospelova T.I., Rodionova A.Yu., Usacheva E.I. Quality of life and symptoms in patients with myelofibrosis during the treatment: Data of clinical practice
- Klyasova G.A., Korobova A. G., Frolova I.N., Okhmat V.A., Kulikov S.M., Parovichnikova E.N., Kravchenko S.K. Detection of extended-spectrum β-lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) in patients with acute myeloid leukemia and lymphoma at admission to the hospital
- Drokov M.Yu., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A., Galtseva I.V., Vasilieva V.A., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Savchenko V.G. Role of granzyme B in T regulatory cells in patients after allogeneic stem cell transplantation
- Tikhomirov D.S., [Garanzha T.A.], Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Galstyan G.M., Filatov F.P. Factors affecting the incidence of viral pneumonia in patients with hematological malignancies
- Smetanina N.S., Tereshchenko G.V., Krasilnikova M.V., Gvozdev A.A., Ibragimova D.I., Mitrofanova A.M., Lokhmatova M.E., Novichkova G.A. Assessment of iron accumulation in children with transfusion dependent β-thalassemia
- Andreeva T.A., Lavrichenko I.A., Klimova N.I., Zalepukhina O.E., Konstantinova V.N., Kim A.V. Management of patients with von Willebrand disease: practice of St.Petersburg City Hemophilia Care Centre

ОБМЕН ОПЫТОМ

EXCHANGE OF EXPERIENCE

- Гордеева О.Б., Тепаев Р.Ф., Ботвиньева В.В., Ботвиньев О.К., Симонова О.И., Горинова Ю.В. Витамин К-зависимые геморрагические состояния у детей после периода новорожденности..... 54-56
- Gordeeva O.B., Tepaev R.F., Botvineva V.V., Botvinev O.K., Simonova O.I., Gorinova Yu.V. Vitamin K dependent hemorrhagic conditions in infants after the newborn period

Журнал "Гематология и трансфузиология" входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук, опубликованный в бюллетене ВАК Министерства образования и науки РФ.

Журнал "Гематология и трансфузиология" индексируется в следующих информационных системах: РИНЦ, Scopus, Web of Science, Excerpta Medica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Index Medicus; INIS Atomindex (International Nuclear Information System); Nutrition Abstracts and Reviews; Ulrich's International Periodicals Directory.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

© ОАО «Издательство «Медицина», 2016

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392.8-036.12-085-037

Фоминых М.С.¹, Абдулкадыров К.М.¹, Туркина А.Г.², Шуваев В.А.¹, Мартынкевич И.С.¹,
Цаур Г.А.^{3,4}, Бедерак Н.В.⁵, Чельшева Е.Ю.², Шухов О.А.², Абдуллаев А.О.², Удальева В.Ю.¹,
Зотова И.И.¹, Шихбабаева Д.И.¹, Полушкина Л.Б.¹, Иванова М.П.¹, Петрова Е.В.¹,
Мартыненко Л.С.¹, Клейна Е.В.¹, Цыбакова Н.Ю.¹

ПЕРСОНАЛИЗАЦИЯ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА – ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ДИНАМИКИ УРОВНЯ BCR-ABL

¹ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА, 191024, г. Санкт-Петербург, Россия; ²ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия; ³ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница №1», 620149, г. Екатеринбург, Россия; ⁴ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», 620026, г. Екатеринбург; ⁵МБУ «Центральная городская больница №7», 620137, г. Екатеринбург.

Актуальность. Больные хроническим миелолейкозом представляют собой гетерогенную группу. В настоящее время наиболее актуальной проблемой в терапии заболевания является ее персонализация, основанная на индивидуальных характеристиках больного.

Цель исследования – изучение индивидуального прогностического значения скорости снижения уровня BCR-ABL в течение первых 3 мес терапии ингибиторами тирозинкиназ.

Материал и методы. В исследование включены 54 больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе. В качестве терапии 1-й линии больные получали: иматиниб 400 мг/сут ($n = 41$), нилотиниб 600 мг/сут ($n = 12$), дазатиниб ($n = 1$). Уровень относительной экспрессии BCR-ABL гена определяли по международной шкале в момент диагностики, через 3, 6 и 12 мес терапии ингибиторами тирозинкиназ. Оценивали соотношение уровней экспрессии BCR-ABL через 3 мес терапии и в момент диагностики, частоту достижения больными раннего молекулярного ответа через 3 мес лечения (BCR-ABL не более 10%) и большой молекулярный ответ (БМО) через 12 мес терапии, а также соотношение уровня экспрессии BCR-ABL через 3 мес и уровня, достигнутому к 1-му месяцу терапии.

Результаты. У 26 (76,5%) из 34 больных с соотношением уровней BCR-ABL через 3 мес терапии и в момент диагностики меньше 0,1 был достигнут БМО к 12-му месяцу терапии, и только у 9 (45%) из 20 больных с соотношением больше 0,1 был достигнут оптимальный ответ на 1 год терапии ($p = 0,02$). Соотношение уровня экспрессии через 3 мес к уровню через 1 мес также показало, что у 5 (83,3%) из 6 больных с соотношением меньше 0,1 был достигнут БМО на 1 год терапии, при этом только 1 (16,7%) больной с соотношением больше 0,1 достиг оптимального ответа ($p = 0,04$). При сравнении этих данных с группой больных, достигших раннего молекулярного ответа через 3 мес терапии (BCR-ABL менее 10% IS), получены следующие результаты: 33 (71,7%) из 46 больных с уровнем BCR-ABL не более 10% достигли БМО к 12-му месяцу лечения, и 2 (25%) из 8 больных с уровнем BCR-ABL более 10% достигли БМО на 1 год терапии ($p = 0,02$). При использовании для прогнозирования достижения оптимального ответа соотношения уровня BCR-ABL через 3 мес терапии к начальному уровню терапии среди больных с ранним молекулярным ответом (BCR-ABL не более 10% на 3 мес терапии) дополнительно были выявлены 5 больных с плохим прогнозом заболевания, которые не достигли БМО к 12-му месяцу.

Индивидуальная скорость снижения уровня BCR-ABL в течение первых 3 мес терапии по отношению к начальному индивидуальному уровню может быть использована как прогностический маркер вероятности достижения БМО через 12 мес терапии.

К л ю ч е в ы е с л о в а: хронический миелолейкоз; индивидуализация терапии; ингибиторы тирозинкиназ; BCR-ABL; большой молекулярный ответ.

Для цитирования: Фоминых М.С., Абдулкадыров К.М., Туркина А.Г., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Цаур Г.А., Бедерак Н.В., Чельшева Е.Ю., Шухов О.А., Абдуллаев А.О., Удальева В.Ю., Зотова И.И., Шихбабаева Д.И., Полушкина Л.Б., Иванова М.П., Петрова Е.В., Мартыненко Л.С., Клейна Е.В., Цыбакова Н.Ю. Персонализация терапии хронического миелолейкоза – прогностическое значение индивидуальной динамики уровня BCR-ABL. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(1): 4-10. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-4-10

Fominykh M.S.¹, Abdulkadyrov K.M.¹, Turkina A.G.², Shuvaev V.A.¹, Martynkevich I.S.¹, Tsauro G.A.³, Bederak N.V.⁴,
Chelysheva E.Yu.², Shukhov O.A.², Abdullaev A.O.², Udaleva V.Yu.¹, Zotova I.I.¹, Shikhbabaeva D.I.¹, Polushkina L.B.¹,
Ivanova M.P.¹, Petrova E.V.¹, Martynenko L.S.¹, Kleina E.V.¹, Tsybakova N.Yu.¹

PERSONALIZATION OF CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA TREATMENT – PROGNOSTIC VALUE OF THE INDIVIDUAL RATE OF BCR-ABL LEVEL DECLINE

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.Petersburg, 191024, Russian Federation; ²National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation; ³Regional Children's Clinical Hospital No. 1, Ekaterinburg, 620149, Russian Federation; ⁴Ekaterinburg Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, 620926, Russian Federation; ⁵Municipal Central Hospital No. 7, Ekaterinburg, 620137, Russian Federation

Relevance. Chronic myelogenous leukemia (CML) patients represent the heterogeneous group. Several studies in recent years were aimed to personalize treatment based on individual patients characteristics.

Aim of study. The aim of our study was to assess prognostic value of individual BCR-ABL decline rate in the first three months of CML therapy to predict optimal response.

Patients and methods. Fifty-four patients with chronic phase CML were included in the study. Forty-one patients started treatment with Imatinib 400 mg/day, 12 patients started with Nilotinib 600 mg/day and 1 patient started with Dasatinib 100 mg/day. BCR-ABL level was determined by International Scale at the moment of

diagnosis and after 3, 6 and 12 months with ITK therapy. The ratio of *BCR-ABL* levels at 3 months to baseline for each patient, frequency of the achievement of the early molecular response at 3 months (10% by IS) and MMR at 12 months were assessed; in addition, we calculated ratio of *BCR-ABL* levels at 3 months to *BCR-ABL* levels at 1 month.

Twenty-six out of 34 patients (76.5%) with ratio of *BCR-ABL* levels at 3 months to baseline below than 0,1 achieved MMR at 12 months, while only 9 out of 20 patients (45%) with ratio more than 0,1 had optimal response ($p = 0.02$). Ratio of *BCR-ABL* levels at 3 months to *BCR-ABL* levels at 1 month showed much better results with the same (0.1) cut-off value – 5 out of 6 patients (83.3%) with ratio *BCR-ABL* levels at 3 months to *BCR-ABL* levels at 1 month below than 0.1, while only the 1 patient (16.7%) with ratio more than 0.1 achieved optimal response ($p = 0.04$), respectively. Application of early molecular response at 3 months (10% by IS) yielded worse discrimination results: 33 of 46 (71.7%) patients with *BCR-ABL* level $\leq 10\%$ at 3 months, whereas 2 of 8 (25%) patients with *BCR-ABL* $> 10\%$ had MMR at 1 year ($p = 0.02$), respectively. Furthermore, application of our ratio cut-off value in patients with early molecular response (*BCR-ABL* level $\leq 10\%$ at 3 months) allowed us to reveal additional 5 high-risk patients who have not reached MMR after 1 year of therapy.

Conclusion. Our study showed that individual *BCR-ABL* level decline rate estimated in the first three months of CML therapy from the baseline to the level measured at 3 months might be useful as an optimal predictor of outcome for CML patients (MMR after 1 year of treatment).

Key words: chronic myeloid leukemia; individualization of therapy; tyrosine kinase inhibitors; *BCR-ABL*; major molecular response.

For citation: Fominykh M.S., Abdulkadyrov K.M., Turkina A.G., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S., Tsaur G.A., Bederak N.V., Chelysheva E.Yu., Shukhov O.A., Abdullaev A.O., Udaleva V.Yu., Zotova I.I., Shikhbabaeva D.I., Polushkina L.B., Ivanova M.P., Petrova E.V., Martynenko L.S., Kleina E.V., Tsybakova N.Yu. Personalization of chronic myelogenous leukemia treatment – prognostic value of the individual rate of *BCR-ABL* level decline. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2016; 61(1): 4-10. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-4-10

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Funding. The study had no sponsorship.

Received 18 November 2015

Accepted 11 February 2016

Применение ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) в течение последних 15 лет позволило значительно повысить выживаемость больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ). По данным исследования IRIS, 8-летняя общая выживаемость (ОВ) при лечении иматинибом составляет 85%, выживаемость без прогрессирования до фазы акселерации (ФА) и бластного криза (БК) – 92% [1]. Частота прогрессирования в продвинутой фазе при терапии иматинибом более 5 лет не превышает 0,5% в год. Больные с ранним молекулярным ответом (РМО), т.е. с содержанием *BCR-ABL* по международной шкале (IS) не более 10% через 3 мес терапии ИТК, достигают 95% ОВ к 5-и годам терапии [2].

Несмотря на высокую эффективность ИТК, у некоторых больных наблюдается первичная или вторичная резистентность к проводимой терапии. Возможными причинами развития резистентности могут быть как несоблюдение протокола терапии и необоснованные перерывы в лечении, так и биологически обусловленные механизмы (*BCR-ABL*-зависимые или независимые) [3]. К сожалению, далеко не все механизмы резистентности при ХМЛ могут быть оценены в реальной клинической практике [4]. Больные с резистентным к терапии течением ХМЛ требуют своевременного переключения на терапию ИТК 2-го поколения (ИТК2), а в некоторых

случаях – проведения трансплантации аллогенного костного мозга [5].

С целью раннего выявления больных ХМЛ с высоким риском прогрессирования заболевания и высоким риском развития резистентности к терапии, введено понятие групп риска, применяемое к больным только с хронической фазой (ХФ) ХМЛ. В настоящее время в клинической практике широко используют следующие прогностические шкалы: Sokal, Hasford/EURO, EUTOS [6–8]. В дополнение к перечисленным выше шкалам, согласно рекомендациям по диагностике и лечению ХМЛ European LeukemiaNet [9, 10] и Российского Национального гематологического общества [11], в качестве прогностических маркеров используют результаты оценки цитогенетического и молекулярно-генетического ответа на определенных сроках терапии (3, 6, 12 мес лечения) [9–12].

В зависимости от объема лейкоэмического клона на каждом сроке, эффект терапии 1-й линии может быть расценен как оптимальный, предупреждение и неудача терапии. Неудача терапии предполагает низкую вероятность длительной выживаемости без прогрессии и является показанием к ее смене [13]. В данных рекомендациях делается акцент на то, что экспрессия гена *BCR-ABL* выше 10% после 3 мес терапии ИТК свидетельствует о неблагоприятном прогнозе и после подтверждения данного факта при

Для корреспонденции:

Фоминых Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, 191024, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: m.s.fominyh@gmail.com.

For correspondence:

Fominykh Mikhail S., MD, PhD, research assistant Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.Petersburg, 191024, Russian Federation. E-mail: m.s.fominyh@gmail.com.

Information about author:

Fominykh Mikhail S., <http://orcid.org/0000-0001-6552-8023>; Turkina A.G., <http://orcid.org/0000-0001-9947-2371>; Shuvaev V.A., <http://orcid.org/0000-0003-3536-0770>; Martynkevich I.S., <http://orcid.org/0000-0001-5958-0490>; Tsaur G.A., <http://orcid.org/0000-0002-9881-6221>; Chelysheva E.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-6423-1789>; Shukhov O.A., <http://orcid.org/0000-0001-5393-0816>; Abdullaev A.O., <http://orcid.org/0000-0003-2530-808X>; Shikhbabaeva D.I., <http://orcid.org/0000-0002-1384-1621>; Polushkina L.B., <http://orcid.org/0000-0003-0051-2121>; Ivanova M.P., <http://orcid.org/0000-0001-5450-2944>; Petrova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-6052-6472>; Martynenko L.S., <http://orcid.org/0000-0003-1428-3059>; Tsybakova N.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-0107-6184>.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика больных ХМЛ на момент установления диагноза

Клинико-лабораторные характеристики	Число больных	
	абс.	%
Возраст (медиана), годы	52 (19–84)	
Пол:		
м	24	44,4
ж	30	55,6
Группы риска EUTOS:		
низкий риск	48	88,9
высокий риск	6	11,1
Группы риска Sokal:		
низкий риск	30	55,6
промежуточный	14	25,9
высокий риск	10	18,5
Медиана экспрессии гена <i>BCR-ABL</i> на момент диагностики (IS), %	41,46 (3,39–3185,36)	
Терапия 1-й линии:		
иматиниб 400 мг/сут	41	76
нилотиниб 600 мг/сут	12	22,2
дазатиниб 100 мг/сут	1	1,8
Всего больных...	54	

повторном молекулярном исследовании необходимо решить вопрос о переключении на 2-ю линию терапии ИТК. Содержание *BCR-ABL* менее 10% через 3 мес терапии обозначен как РМО.

В последние годы появились исследования, авторы которых обращают внимание не только на объем лейкоемического клона на определенных сроках терапии ИТК при ХМЛ (3, 6, 12 мес терапии), но и оценивают индивидуальные характеристики ответа на лечение, а именно индивидуальный клиренс опухолевого клона, определяемый при ХМЛ как скорость снижения уровня *BCR-ABL* или соотношение экспрессии *BCR-ABL* на разных сроках [14, 15].

В одном из таких исследований [14] показано прогностическое значение скорости снижения

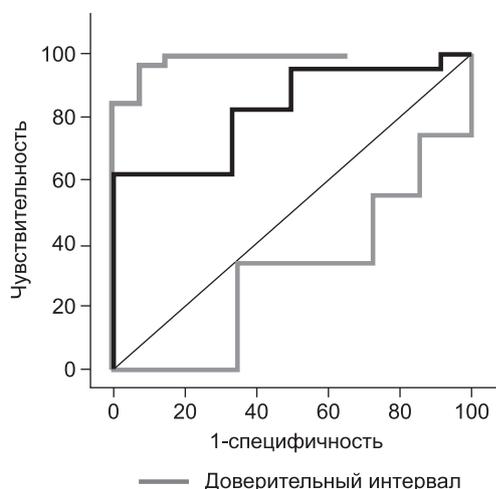


Рис. 1. Информативность соотношения уровня экспрессии *BCR-ABL* к 3 мес терапии ингибиторами тирозинкиназ у больных ХМЛ к уровню в момент диагностики для прогноза достижения БМО к 12 мес терапии.

Таблица 2

Пороговые значения информативности соотношения уровня экспрессии *BCR-ABL* к 3-му месяцу терапии ингибиторами тирозинкиназ у больных ХМЛ к уровню экспрессии *BCR-ABL* на момент диагностики

Значение	Чувствительность	95% ДИ	Специфичность	95% ДИ
< 0	0	0–14,2	100	73,5–100
≤ 0,0275	62,5	40,6–81,2	100	73,5–100
≤ 0,0632	62,5	40,6–81,2	66,67	34,9–90,1
≤ 0,1008	83,33	62,6–95,3	66,67	34,9–90,1
≤ 0,1982	83,33	62,6–95,3	50	21,1–78,9
≤ 0,268	95,83	78,9–99,9	50	21,1–78,9
≤ 0,61	95,83	78,9–99,9	8,33	0,2–38,5
≤ 1,8912	100	85,8–100	8,33	0,2–38,5
≤ 5,1569	100	85,8–100	0	0–26,5

Примечание. Жирным шрифтом выделено пороговое значение соотношения уровней экспрессии *BCR-ABL* через 3 мес и в момент диагностики для прогноза достижения БМО к 1-му году терапии ИТК, имеющее наилучший баланс чувствительности и специфичности.

соотношения уровней экспрессии *BCR-ABL* в течение первых 3 мес терапии. Результаты определения уровня экспрессии *BCR-ABL* в этом исследовании были представлены по отношению к экспрессии гена *GUS*, который в настоящее время редко используют в качестве контрольного гена для определения относительного уровня *BCR-ABL*. Оценку информативности соотношения уровня экспрессии *BCR-ABL/ABL* при применении стандартного мониторинга авторы этого исследования не проводили. Одним из препятствий для применения уровня *BCR-ABL/ABL* в момент диагностики является искажение (нелинейность) результатов измерения значений экспрессии гена *BCR-ABL* выше 10% [14].

В исследовании S. Branford и соавт. [15] продемонстрирована возможность применения для прогнозирования эффективности терапии ИТК так называемой «двукратной скорости снижения экспрессии *BCR-ABL*». В группе больных, у которых не было достигнуто снижения уровня экспрессии *BCR-ABL* менее 10% через 3 мес терапии, дополнительно проводили оценку «двукратного снижения». Отмечено, что при «двукратном снижении» менее 76 дней 4-летняя ОВ была значительно выше, чем при значении более 76 дней: 95 и 58% соответственно ($p = 0,0002$). Кроме того, большой молекулярный ответ (БМО) на протяжении всего наблюдения получен у 54% больных в первой группе и только у 5% во второй группе ($p = 0,008$) [15].

Целью нашего исследования являлась оценка информативности методики установления индивидуального соотношения, определяющего динамику снижения уровня экспрессии *BCR-ABL/ABL* в течение первых 3 мес терапии больных ХМЛ ИТК, для прогнозирования ее эффективности.

Материал и методы

В исследование были включены 54 больных ХМЛ, соответствующих критериям включения и исключения. Критериями включения были: диагноз ХФ ХМЛ; наличие данных об уровне экспрессии *BCR-ABL* в момент диагностики; наличие данных об уровне экспрессии *BCR-ABL* через 3, 6 и 12 мес

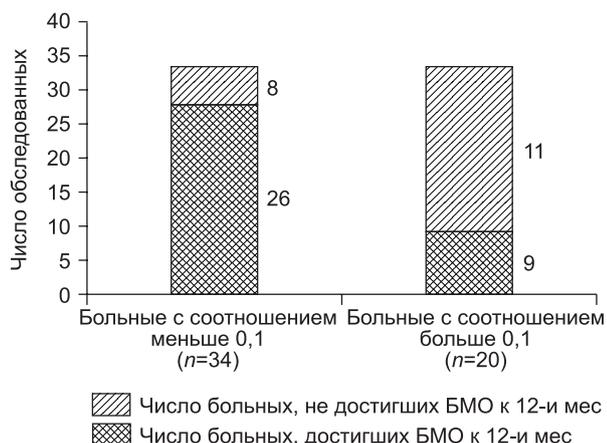


Рис. 2. Частота достижения БМО у больных ХМЛ с соотношением уровня $BCR-ABL$ после 3 мес терапии к начальному уровню ($p = 0,02$).

терапии ИТК; наличие данных цитогенетического исследования костного мозга через 3, 6 и 12 мес терапии ИТК; наличие данных о режиме терапии, дозе ИТК и данных о приверженности к терапии. Критериями исключения являлись: продвинутое состояние ХМЛ (ФА и БК), наличие атипичных транскриптов гена $BCR-ABL$.

Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБУ «РосНИИГТ» ФМБА России. Все больные ХМЛ дали информированное согласие на участие в исследовании.

Клинико-лабораторные характеристики пациентов представлены в табл. 1. Мониторинг уровня экспрессии $BCR-ABL$ проводили у всех пациентов методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в момент диагностики и через 3, 6 и 12 мес терапии ИТК, оценку экспрессии $BCR-ABL$ выполняли по отношению к экспрессии гена ABL . У 12 пациентов из этой группы уровень $BCR-ABL$ оценивали также и через 1 мес терапии. Медиана наблюдения составила 27 (диапазон 12–59) мес.

Для всех больных было оценено соотношение уровней экспрессии $BCR-ABL$ через 3 мес и в момент диагностики. Оценивали прогностическую значимость изменения индивидуального уровня экспрессии $BCR-ABL$ для достижения оптимального ответа. Оптимальным ответом к 1 году терапии ИТК считали достижение БМО [9–12].

Для установления пороговых значений характеристик чувствительности и специфичности применяли ROC-анализ, определяющий прогностическую способность динамики индивидуального уровня экспрессии $BCR-ABL$ для достижения БМО к 1 году терапии ИТК [16]. Пороговое течение соотношения уровней экспрессии $BCR-ABL$ через 3 мес и в момент диагностики для прогноза достижения БМО к 1 году терапии ИТК, имеющее наилучший баланс чувствительности и специфичности, было 0,1 [17]. Чувствительность данного порогового уровня (0,1) составляла 83,33% – доверительный интервал (ДИ 62,6–95,3%); специфичность 66,67% (ДИ 34,9–90,1%) [18, 19]. Результаты ROC-анализа представлены на рис. 1 и в табл. 2.

Было проведено сравнение предсказательных способностей: методики индивидуального отношения, определяющего динамику снижения уровня экспрессии $BCR-ABL$ в течение первых 3 мес терапии ИТК и достижения РМО через 3 мес лечения ($BCR-ABL$ не более 10%). Статистический анализ значимости различий проводили с помощью точного критерия Фишера. Зависимость между уровнем $BCR-ABL$ на 1 год терапии и динамикой индивидуального уровня $BCR-ABL$ в течение первых 3 мес терапии оценивали с помощью многофакторного регрессионного анализа. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$ [16].

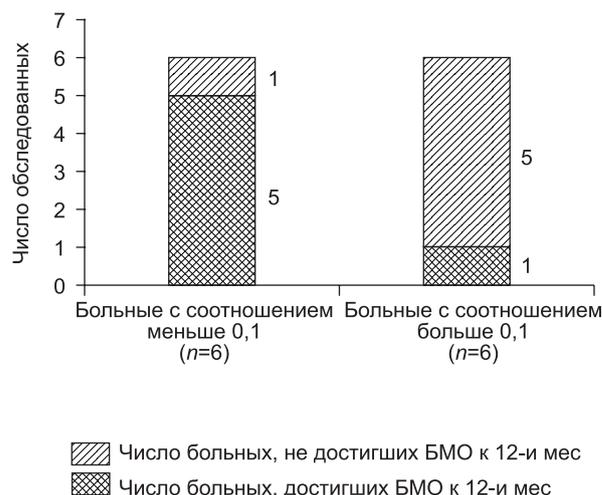


Рис. 3. Частота достижения БМО у больных ХМЛ с соотношением уровня $BCR-ABL$ через 3 мес к уровню через 1 мес терапии ($p = 0,04$).

Результаты

У 26 (76,5%) из 34 больных с соотношением уровня $BCR-ABL$ через 3 мес терапии и в момент диагностики меньше 0,1 был достигнут БМО к 12 мес терапии, в то время как только 9 (45%) из 20 больных с соотношением больше 0,1 достигли оптимального ответа на 1 год терапии ($p = 0,02$) (рис. 2).

Соотношение уровня экспрессии через 3 мес к уровню через 1 мес также показало, что 5 (83,3%) из 6 больных с соотношением меньше 0,1 достигли БМО на 1 год терапии, при этом только 1 (16,7%) больной с соотношением больше 0,1 достиг оптимального ответа ($p = 0,04$) (рис. 3).

При сравнении этих данных с группой больных, достигших РМО через 3 мес терапии ($BCR-ABL$ менее 10% IS), получены следующие результаты: 33 (71,7%) из 46 больных с уровнем $BCR-ABL$ не более 10% достигли БМО к 12 мес лечения, 2 (25%) из 8 с уровнем $BCR-ABL$ более 10% достигли БМО к 12 мес терапии ($p = 0,02$) (рис. 4).

При использовании для прогнозирования достижения оптимального ответа соотношения уровня $BCR-ABL$ через 3 мес терапии к начальному уровню терапии среди больных с РМО ($BCR-ABL$ не более 10% на 3 мес терапии) дополнительно были выяв-

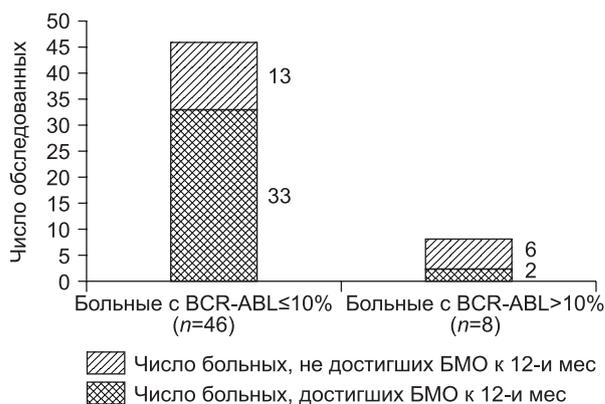


Рис. 4. Частота достижения БМО к 12 мес терапии у больных ХМЛ с ранним молекулярным ответом ($BCR-ABL$ не более 10% через 3 мес терапии); $p = 0,02$.

Таблица 3

Частота достижения БМО в зависимости от индивидуального соотношения уровня экспрессии *BCR-ABL* в течение первых 3 мес терапии больных ХМЛ ИТК и больных, достигших РМО через 3 мес терапии (*BCR-ABL* менее 10% IS)

Группа больных	Число больных	Число больных, достигших БМО к 12 мес		P
		абс.	%	
<i>BCR-ABL</i> через 3 мес терапии:				
не более 10%	46	33	71,7	0,02
более 10%	8	2	25	
Соотношение уровней <i>BCR-ABL</i> на 3 мес:				
к начальному уровню:				
менее 0,1	34	26	76,5	0,02
более 0,1	20	9	45	
к 1 мес:				
менее 0,1	6	5	83,3	0,04
более 0,1	6	1	16,7	

лены у 5 больных с плохим прогнозом заболевания, которые не достигли БМО к 12 мес (табл. 3).

Данные, полученные при разделении больных по частоте достижения оптимального ответа на терапию различными ИТК, подробно представлены в табл. 4. Интересным фактом, полученным нами, является то, что в случае неэффективности ИТК1, своевременная смена терапии на ИТК2 у резистентных к терапии больных приводила к частоте достижения БМО на 1 год лечения, схожей с общей группой ИТК1.

В результате многофакторного регрессионного анализа оценена значимость взаимосвязи уровня *BCR-ABL* на 1 год терапии со следующими параметрами: уровень *BCR-ABL* на 3 мес лечения (не более 10%/более 10%; $p = 0,51$), индивидуального соотношения уровня экспрессии *BCR-ABL* на 3 мес к уровню на момент диагностики (менее 0,1/более 0,1; $p = 0,044$), вида терапии больных в 1-й линии (ИТК1/ИТК2; $p = 0,0002$), смена терапии при недостаточной эффективности ИТК1 на ИТК2 (да/нет; $p < 0,0001$).

Обсуждение

Поиск суррогатных маркеров для раннего определения больных ХМЛ с высоким риском прогрессирования заболевания остается до сих пор актуальным вопросом. Существующие шкалы определения групп риска учитывают только фазу заболевания на момент диагностики и не оценивают индивидуальную скорость элиминации опухолевого клона и возможную переносимость проводимой терапии [6–8]. Некоторая часть больных низкой группы риска по всем прогностическим шкалам может не достигнуть оптимального ответа на определенных этапах терапии по разным причинам: неудовлетворительная переносимость лечения (гематологическая и негематологическая токсичность), первичная резистентность, низкая приверженность к терапии. Токсичность, которая развивается в ходе терапии, очень часто приводит к временной отмене ИТК, что в свою очередь снижает эффективность лечения [20–27].

Таблица 4

Частота достижения оптимального ответа (БМО) у больных ХМЛ через 1 год терапии (оптимальный ответ) в зависимости от вида терапии 1-й линии

Группа больных	ИТК1 (n = 41)			ИТК1 со сменой на ИТК2 (n = 14)			ИТК2 (n = 13)		
	n	БМО 12 мес		n	БМО 12 мес		n	БМО 12 мес	
		абс.	%		абс.	%		абс.	%
<i>BCR-ABL</i> на 3 мес терапии:									
не более 10%	33	23	69,7	6	4	66,7	13	10	76,9
более 10%	8	2	25	8	2	25	0	0	0
Соотношение уровней <i>BCR-ABL</i> на 3 мес к начальному уровню:									
менее 0,1	23	17	73,9	1	1	100	11	9	81,8
более 0,1	18	8	44,4	13	5	38,5	2	1	50

Именно поэтому последние исследования ведущих клинических центров в первую очередь направлены на персонализацию терапии, основанную на индивидуальных характеристиках больного [14, 15].

Известно, что после начала терапии ИТК у больных ХМЛ происходит быстрое снижение размеров опухолевой массы, что делает возможным оценку отношения уровня экспрессии *BCR-ABL* через 3 мес терапии к уровню через 1 мес терапии и помогает избавиться от «нелинейности».

Учитывая все эти факторы, которые в конечном счете влияют на эффективность лечения, гипотеза о потенциальном прогностическом значении скорости снижения уровня *BCR-ABL* во время лечения представляется заслуживающей внимания.

Полученные в ходе нашего исследования данные согласуются с исследованиями В. Hanfstein и соавт., а также S. Branford и соавт. [14, 15]. Вместе с тем ограничениями применения в клинической практике данных методик являются:

- использование в качестве гена-нормализатора гена *GUS*, в то время как стандартом контрольного гена в подавляющем большинстве лабораторий является ген *ABL* [14];

- сложность расчета «двукратной скорости снижения экспрессии *BCR-ABL*» в методике S. Branford и соавт. [15].

Таким образом, разработанная нами методика отличается от двух предыдущих простотой в использовании и большей прикладной ценностью. По последним данным литературы [28], японская группа исследователей получила схожие результаты для прогнозирования эффективности при терапии ИТК2.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что индивидуальная скорость снижения уровня *BCR-ABL* в течение первых 3 мес терапии по отношению к начальному уровню может быть использована как прогностический маркер вероятности достижения БМО через 12 мес терапии. При многофакторном анализе соотношение индивидуального уровня *BCR-ABL* через 3 мес терапии к начальному уровню, а также вид терапии 1-й линии (ИТК1/ИТК2) и фактор смены терапии при неэффективности ИТК1, оказывает статистически значимое влияние на уровень *BCR-ABL* к 12 мес терапии. Тогда как достижение

РМО (*BCR-ABL* не более 10% через 3 мес терапии) не показывает данной взаимосвязи.

Эти результаты помогают правильно сориентироваться в тактике ведения больных, вовремя произвести смену терапии и определить большее число больных в группу оптимального ответа, что особенно важно для предупреждения прогрессии и получения более глубоких молекулярных ответов в будущем.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в течение 1-го месяца терапии ИТК у больных ХМЛ происходит частичная элиминация опухолевого клона, тем самым достигается уменьшение риска примеси опухолевого клона гена *BCR-ABL* к гену-нормализатору *ABL*. Полученные данные позволяют применять *ABL*, как контрольный ген при проведении сравнительного анализа.

Соотношение уровня *BCR-ABL* через 3 мес терапии к уровню через 1 мес может также применяться как суррогатный прогностический маркер, но требует дальнейшего изучения в последующих исследованиях.

Таким образом, учитывая хороший прогноз длительной выживаемости у большинства больных ХМЛ, важно уже на первых этапах терапии выделить группу больных неблагоприятного прогноза. Подбор максимально эффективной и переносимой терапии у этих пациентов и своевременная смена терапии ИТК с учетом оценки клиренса опухоли позволит улучшить результаты лечения и снизить риск прогрессии заболевания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

3. Чельшева Е.Ю., Шухов О.А., Лазарева О.В., Туркина А.Г. Мутации киназного домена гена *BCR-ABL* при хроническом миелолейкозе. *Клиническая онкогематология*. 2012; 1(5): 13–21.
11. Абдулкадыров К.М., Абдуллаев А.О., Авдеева Л.Б., Афанасьев Б.В., Виноградова Е.Ю., Виноградова О.Ю., и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и терапии хронического миелолейкоза. *Вестник гематологии*. 2013; 9(3): 4–47.
12. Туркина А.Г., Чельшева Е.Ю. Стратегия терапии хронического миелолейкоза: возможности и перспективы. *Терапевтический архив*. 2013; 7: 4–9.
18. Фоминых М.С., Шуваев В.А., Абдулкадыров К.М., Туркина А.Г., Мартынкевич И.С., Цаур Г.А. и др. Прогностическое значение снижения индивидуального уровня *BCR-ABL* в течение первых трех месяцев терапии для достижения большого молекулярного ответа у больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе. *Медицинская генетика*. 2015; 14 (4, вып.154): 31–2.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Deininger M., O'Brien S.G., Guilhot F., Goldman J.M., Hochhaus A., Hughes T.P., et al. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology. ASH Annual Meeting (Abstracts). *Blood*. 2009; 114(22): 462. Abstr. 1126. <https://ash.confex.com/ash/2009/webprogram/Paper23968.html>
2. Hanfstein B., Muller M.C., Hehlmann R., Erben P., Lauseker M., Fabarius A., et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia*. 2012; 26(9): 2096–102.
3. Chelysheva E.Yu., Shukhov O.A., Lazareva O.V., Turkina A.G. *BCR-ABL* kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice (Klinicheskaya onkogematologiya)*. 2012; 5(1): 13–21. (in Russian)
4. Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M., Cortes J.E. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009; 16(2): 122–31.
5. Saussele S., Lauseker M., Gratwohl A., Beelen D.W., Bunjes D., Schwerdtfeger R., et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo SCT) for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood*. 2010; 115(10): 1880–5.
6. Sokal J.E., Cox E.B., Baccarani M., Tura S., Gomez G.A., Robertson J.E., et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984; 63(4): 789–99.
7. Hasford J., Pflirrmann M., Hehlmann R., Allan N.C., Baccarani M., Kluin-Nelemans J.C., et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90(11): 850.
8. Hasford J., Baccarani M., Hoffmann V., Guilhot J., Saussele S., Rosti G., et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011; 118(3): 686–92.
9. Baccarani M., Cortes J., Pane F., Niederwieser D., Saglio G., Apperley J.F., et al.; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(35): 6041–51. doi: 10.1200/JCO.2009.25.0779.
10. Baccarani M., Deininger M.W., Rosti G., Hochhaus A., Soverini S., Apperley J.F., et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013; 122(6): 872–84. doi: 10.1182/blood-2013-05-501569.
11. Abdulkadyrov K.M., Abdullaev A.O., Avdeeva L.B., Afanasyev B.V., Vinogradova E.Y., Vinogradova O.Y., et al. Federal clinical guidelines for chronic myelogenous leukemia diagnosis and treatment. *Journal of Hematology.Russian Journal (Vestnik gematologii)*. 2013; 9(3): 4–47. (in Russian)
12. Turkina A.G., Chelysheva E.Y. Therapeutic strategy for chronic myeloid leukemia: possibilities and prospects. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2013; 7: 4–9. (in Russian).
13. Marin D., Milojkovic D., Olavarria E., Khorashad J.S., de Lavallade H. Reid A.G., et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood*. 2008; 112(12): 4437–44. doi: 10.1182/blood-2008-06-162388.
14. Hanfstein B., Shlyakhto V., Lauseker M., Hehlmann R., Saussele S., Dietz S., et al.; SAKK and the German CML Study Group. Velocity of early *BCR-ABL* transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014; 28(10): 1988–92. doi: 10.1038/leu.2014.153.
15. Branford S., Yeung D.T., Parker W.T., Roberts N.D., Purins L., Bralley J.A., et al. Prognosis for patients with CML and >10% *BCR-ABL1* after 3 months of imatinib depends on the rate of *BCR-ABL1* decline. *Blood*. 2014; 124(4): 511–8. doi: 10.1182/blood-2014-03-566323.
16. Pepe M.S. The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. Oxford University Press; 2003.
17. Shuvaev V., Fominykh M., Martynkevich I., Tsaur G., Bederak N., Chelysheva E., et al. Prognostic value of the rate of *BCR-ABL* decline for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase on tyrosine kinase inhibitors treatment. (56th ASH Annual Meeting Abstracts). 2014; 124(21): Abstr. 3148.
18. Fominykh M.S., Shuvaev V.A., Abdulkadyrov K.M., Turkina A.G., Martynkevich I.S., Tsaur G.A., et al. Prognostic value of the rate of

- individual BCR-ABL decline in the first three months of treatment to achieve MMR in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Journal Medical Genetics (Meditsinskaya genetika)*. 2015; 14 (4, Issue 154): 31–2. (in Russian)
19. Fominykh M., Shuvaev V., Martynkevich I., Tsaur G., Bederak N., Chelysheva E., et al. The rate of BCR-ABL decline as an optimized predictor of outcome for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase on treatment with tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. 2015; 100 (Suppl. 1): 444.
 20. Khoury J., Guilhot F., Hughes T., Kim D., Cortes J. Dasatinib treatment for Philadelphia chromosome-positive leukemias practical considerations. *Cancer*. 2009; 115(7): 1381–4.
 21. Quintás-Cardama A., Pires De Souza Santos F., Kantarjian H., O'Brien S., Faderl S., Awai A., et al. Dynamics and management of cytopenias associated with dasatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib failure cancer. *Cancer*. 2009; 115(17): 3935–43.
 22. Jabbour E., Deininger M., Hochhaus A. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011; 25(2): 201–10.
 23. Quintás-Cardama A., Kantarjian H., O'Brien S., Borthakur G., Bruzzi J., Munden R., et al. Effusion in patients with chronic myelogenous leukemia treated with dasatinib after imatinib failure. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(25): 136–40.
 24. Jabbour E., Cortes J., Kantarjian H. Long-term outcomes in the second-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2011; 117(5): 897–906.
 25. Nicolini F.E., Turkina A., Shen Z.-X., Gallagher N., Jootar S., Powell B.L., et al. Expanding Nilotinib Access in Clinical Trials (ENACT). *Cancer*. 2012; 118(1): 118–26.
 26. Kantarjian H.M., Shah N.P., Cortes J.E., Baccarani M., Agarwal M.B., Undurraga M.S., et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2012; 119(5): 1123–9.
 27. Shah N.P., Kantarjian H.M., Kim D.W., Rea D., Dorlhiac-Llacer P.E., Milone J.H., et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(19): 3204–12. doi: 10.1200/JCO.2007.14.9260.
 28. Murai K., Yamaguchi K., Ito S., Akagi T., Ogawa K., Mitsue I., et al. Velocity of Early BCR-ABL Transcript Elimination as an Optimized Predictor of Deep Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia patients in Chronic Phase on Treatment with Dasatinib. (57th ASH Annual Meeting. Abstracts), *Blood*. 2015; Abstract 4052. <https://ash.confex.com/ash/2015/webprogram/Paper84000.html>

Поступила 18.11.15
Принята к печати 11.02.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-006.448-085.844-036.8

Нарейко М.В., Менделеева Л.П., Сурин В.Л., Демидова Е.Ю., Покровская О.С.,
Кузьмина Л.А., Грибанова Е.О., Гальцева И.В., Урнова Е.С., Дроков М.Ю., Фирсова М.В.,
Соловьев М.В., Макунина Э.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНДУКЦИОННОЙ ТЕРАПИИ У ПЕРВИЧНЫХ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМой В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА С-МУС В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Настоящая работа посвящена определению зависимости характера противоопухолевого ответа на индукционную терапию больных множественной миеломой (ММ) и/или моноклональной гаммапатией неуточненного генеза (МГНГ) от уровня экспрессии гена *c-MYC* на момент диагностики заболевания. Экспрессию *c-MYC* определяли в клетках костного мозга методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qRT-PCR). Среднее значение уровня экспрессии гена *c-MYC* в CD138⁺-клетках у больных ММ/МГНГ выше, чем у доноров ($p = 0,011$). Выявлена взаимосвязь между глубиной противоопухолевого ответа и уровнем экспрессии *c-MYC* в CD138⁺-клетках.

Ключевые слова: множественная миелома; ген *c-MYC*; CD138⁺-клетки.

Для цитирования: Нарейко М.В., Менделеева Л.П., Сурин В.Л., Демидова Е.Ю., Покровская О.С., Кузьмина Л.А., Грибанова Е.О., Гальцева И.В., Урнова Е.С., Дроков М.Ю., Фирсова М.В., Соловьев М.В., Макунина Э.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Эффективность индукционной терапии у первичных больных множественной миеломой в зависимости от уровня экспрессии гена *c-MYC* в дебюте заболевания. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 10-16. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-10-16

Nareiko M.V., Mendeleeva L.P., Surin V.L., Demidova E.Yu., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A., Gribanova E.O., Galtseva I.V., Urnova E.S., Drovkov M.Yu., Firsova M.V., Solovyov M.V., Makunina E.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

EFFICACY OF INDUCTION THERAPY IN PATIENTS WITH DE NOVO DIAGNOSED MULTIPLE MYELOMA DEPENDS ON C-MYC GENE EXPRESSION AT THE DEBUT OF DISEASE

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

The relationship between the type of antitumor response to induction therapy in patients with multiple myeloma (MM) and/or monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and the level of *c-MYC* gene expression at the moment of disease diagnosis is studied. The expression of *c-MYC* in bone marrow cells was evaluated by multiplex RT-PCR. The mean levels of *c-MYC* gene expression in CD138⁺ cells of patients with MM/MGUS are higher than in donors ($p = 0.011$). Relationship between the depth of antitumor response and level of *C-myc* expression in CD138⁺ cells is detected.

Key words: multiple myeloma; *c-MYC* gene; CD138⁺ cells.

For citation: Nareiko M.V., Mendeleeva L.P., Surin V.L., Demidova E.Yu., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A., Gribanova E.O., Galtseva I.V., Urnova E.S., Drovkov M.Yu., Firsova M.V., Solovyov M.V., Makunina E.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Efficiency of induction therapy in primary patients with multiple myeloma depends on *c-MYC* gene expression at the debut of disease. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiology)*. 2016; 61(1): 10-16. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-10-16

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant No. 15-04-02568).

Received 13 October 2015

Accepted 11 December 2015

В настоящее время множественная миелома (ММ) определяется как клональное лимфопротериативное заболевание, возникающее на уровне пре-В-клеточных стадий моноклонального развития, в предшественниках, сохраняющих способность к дифференцировке до плазмочита [1–5].

ММ составляет 1% от всех онкологических заболеваний и 10–15% от гемобластозов. Заболевают ММ преимущественно люди старшей возрастной группы. Средний возраст среди вновь заболевших больных составляет около 70 лет. Распространенность заболевания среди населения моложе 40 лет не превышает 2%. Отмечено существенное различие по частоте заболеваемости ММ среди различных этнических групп. Среди афроамериканцев она приблизительно в 2 раза выше, чем у белокожего населения [6]. Помимо этого отмечено увеличение частоты заболеваемости ММ среди пациентов с длительной антигенной стимуляцией, например у больных ревматоидным артритом, хроническими бактериальными инфекциями [7]. В 2011 г. в России было зарегистрировано 2862 больных с впервые диагностированной ММ. Таким образом, показатель заболеваемости составил 2 на 100 тыс. населения, при этом соотношение мужчин и женщин равнялось 1:1,4. Приведенные данные демонстрируют рост заболеваемости ММ в России по сравнению с 2007 г., когда этот показатель составлял 2372 первичных случаев ММ в год [8]. Отчасти это связано с улучшением методов диагностики, что увеличивает число выявляемых случаев ММ.

До настоящего времени не установлен этиологический фактор ММ. Механизмом патогенеза является генетически детерминированное нарушение созревания В-лимфоцита. К «уязвимым» периодам клеточной дифференцировки относятся период генетической модификации гена иммуноглобулина (Ig), который состоит из трех этапов: 1) V(D)J-рекомбинация, происходящая на ранних этапах созревания В-клеток; 2) переключение класса Ig; 3) соматическая гипермутация [9]. Определены некоторые генетические события, приводящие к развитию ММ. Наиболее часто транслоцируемыми генами-партнерами для гена *IgH* являются: *CCND1* (хромосома 11), *CCND3* (хромосома 6), *MMSET* (хромосома 4), *c-MAF* (хромосома 16) и *c-MYC* (хромосома 8) [10]. В результате перечисленных выше транслокаций, встречающихся по разным данным у 40–60% больных ММ, гены-партнеры 14-й хромосомы попадают под действие энхансеров локуса генов тяжелых цепей Ig, что в значительной степени усиливает их экспрессию.

Согласно опубликованным данным [11–15], изменение активности гена *MYC* существенно влияет на течение онкологического процесса. Показано, что его гиперэкспрессия сопровождается низкой химиочувствительностью опухоли у онкологических больных, что отрицательно сказывается на прогнозе заболевания. Этот феномен четко очерчен в течении лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, “Double hit”-лимфомы, острых лимфобластных и миелоидных лейкозов, ряда солидных опухолей (рак молочной железы, предстательной железы, кишечника, меланома). Для больных ММ исследования в этом направлении продолжаются.

Изучение активности белка тус было начато сравнительно давно, еще 30 лет назад. Тогда немецкой исследовательской группой [16] было отмечено, что уровень тус м-РНК быстро возрастает при применении факторов для стимуляции покоящихся клеток.

На сегодняшний день известно 6 типов гена *MYC*: *c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC*, *S-MYC*, *B-MYC*, *P-MYC*, из них гены *c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC* относятся к протоонкогенам и могут принимать участие в злокачественном перерождении клеток. Гены *S-MYC*, *B-MYC* являются противоопухолевыми генами и ингибируют опухолевую трансформацию. *P-MYC* – псевдоген, производное гена *L-MYC*. Онкогены семейства *MYC* (*c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC*) в норме экспрессируются только на эмбриональной стадии развития и в делящихся клетках на ранних этапах дифференцировки. Он также является геном раннего ответа на воздействие митогенов. При активации его экспрессии клетка переходит в S-фазу клеточного цикла (G₁/S-переход). Белок с-тус является участником всех пролиферативных и антипролиферативных процессов. При этом как м-РНК гена *c-MYC*, так и конечный продукт – белок с-тус имеют короткое время жизни (от 30 мин до 1 ч) и локализуются в ядре делящейся клетки – области своей потенциальной активности. Вероятнее всего, такой короткий период жизни можно объяснить необходимостью короткой и точной регуляции экспрессии этого гена [17].

При транслокации t(8;14), как уже упоминалось выше, ген *c-MYC* попадает под контроль энхансеров локуса генов тяжелых цепей Ig, что приводит к повышению его экспрессии. Однако приблизительно в 10% от всех случаев ММ перестройки гена *c-MYC* обнаруживаются без вовлечения локуса генов тяжелых цепей Ig. При других вариантах транслокаций, таких как t(2;8), t(8;22), ген *c-MYC* объединяется с локусами легких цепей Ig. В настоящее время по-

Для корреспонденции:

Нарейко Мария Вячеславовна, врач-гематолог, аспирант научно-клинического отделения высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. 125167, г. Москва, Россия. E-mail: nareyko@yandex.ru.

For correspondence:

Nareyko Mariya V., MD, hematologist, post graduate of Clinical Research Department of High-Dose Chemotherapy Hemoblastosis, Depression of Hematopoiesis and Bone Marrow Transplantation of National Research Center for Hematology. Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: nareyko@yandex.ru.

Information about authors:

Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>; Scopus Author ID: 6506926619; Drovok M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9431-8316>; Scopus Author ID 48661939800; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0003-2935-4040>.

казано, что нарушение регуляции гена *c-MYC* происходит не только в результате крупных хромосомных aberrаций (транслокация или амплификация), но также и в результате возникновения точечных мутаций в промоторной зоне, приводящих к его гиперэкспрессии [18]. Помимо этого, повышение экспрессии гена достигается за счет добавления или потери нуклеотидных последовательностей в 5'- или 3'- нетранслируемых районах мРНК. Стабилизация продукта гена *MYC*, а за счет этого и удлинение периода активности белка *c-myc*, наблюдаются при возникновении мутаций как в самом белке, так и в факторах, участвующих в его разрушении [19].

В целом, при ММ частота встречаемости реаранжировок гена *c-MYC* составляет около 50%, в том числе при вялотекущей форме заболевания. Предполагают, что изменение активности этого гена в основном относится к вторичным генетическим событиям при ММ. Однако доказано с помощью иммуногистохимических исследований и методики профилирования экспрессии генов, что гиперэкспрессия гена *c-MYC* наблюдается не только при развернутой клинической картине ММ, но и на стадии моноклональной гаммапатии неуточненного генеза (МГНГ) [20, 21]. Опубликованные результаты различных исследований позволяют сделать вывод, что гиперэкспрессия *c-MYC* приводит к автономии опухоли независимо от этапа, на котором произошло событие перестройки [13].

При исследовании экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ, МГНГ и среди здоровых людей получены следующие данные. Уровень м-РНК гена *c-MYC* в случае выявления в нем реаранжировок выше, чем при ММ без перестроек гена *c-MYC*. При этом нет различий между уровнем экспрессии исследуемого гена в случаях с перестройками в самом гене по сравнению с ситуацией, когда выявляется транслокация с его участием. Также отмечено, что средний уровень экспрессии мРНК гена *c-MYC* всегда выше при ММ, чем при МГНГ. В свою очередь у больных с МГНГ уровень экспрессии *c-MYC* значимо выше, чем у здоровых людей [22–24].

Чрезмерная экспрессия гена *c-MYC* ассоциируется с плохим прогнозом для большинства онкологических заболеваний, в том числе и у больных ММ [21]. По мнению М. Jain и соавт. [25], даже временное ингибирование экспрессии гена *c-MYC* при таких заболеваниях, как остеосаркома, рак поджелудочной железы, а также при лимфопролиферативных заболеваниях, приводит к существенному снижению пролиферации опухолевых клеток, индуцируя их апоптоз, в результате чего останавливается рост опухоли. При остеосаркомах ингибирование гена *c-MYC* приводит к дифференцировке опухолевых клеток до остеоцитов, а при реактивации онкогена – к апоптозу опухолевых клеток. Таким образом, авторы делают вывод, что воздействие на активность гена *c-MYC* практически исключает возможность рецидива опухоли, в отличие от стандартных химиотерапевтических методик, что актуально в плане разработки таргетной терапии препаратами биологической направленности действия.

Подобные выводы о значимости роли гена *c-MYC* в развитии опухолевого процесса подкреплены экспериментальными работами. Совместной группой американских, канадских и итальянских исследователей [26] было показано, что при активации гена *c-MYC* В-клеток герминальных центров трансгенных мышей почти в 100% случаев наблюдается переход МГНГ в ММ. Еще в одно исследование [27] были включены мыши двух видов: мыши дикого типа и мыши с *c-MYC*-индуцированной ММ. В рамках эксперимента исследователи подавляли активность гена *c-MYC* в CD138⁺-клетках в обеих линиях мышей. Интересно, что ингибирующее действие было отмечено только в CD138⁺-клеточном пуле, выделенном от мышей с *c-MYC*-индуцированной ММ. У мышей «дикого» типа уровень экспрессии гена *c-MYC* не изменялся. На основании полученных данных исследователи предлагают рассматривать ген *c-MYC* в качестве потенциальной мишени для лекарственных средств.

Опубликованные результаты исследований указывают на актуальность данного научного направления и делают обоснованным детальное изучение *c-MYC*-опосредованной регуляции опухолевого процесса. Настоящая работа посвящена изучению зависимости течения ММ и характера ответа на терапию от уровня экспрессии гена *c-MYC*.

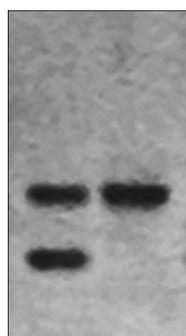
Цель исследования – определение уровня экспрессии гена *c-MYC* у больных с впервые выявленной ММ методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qRT-PCR) относительно уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» *HMBS*, который является рекомендованным для работы с клетками костного мозга [28], а также поиск взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *c-MYC* в тотальном или обогащенном CD138⁺-клетками материале костного мозга и достигнутым противоопухолевым ответом на индукционный этап терапии.

Материал и методы

В исследование включены 40 пациентов (24 мужчины и 16 женщин) в возрасте от 29 до 77 лет (медиана возраста 55,5 года) с впервые диагностированными ММ/МГНГ в период с января 2013 по ноябрь 2014 г. и 9 здоровых доноров костного мозга (группа контроля).

Всем больным проводили стандартное первичное обследование, включающее морфологическое исследование аспирата костного мозга, гистологическое исследование трепанобиоптата, клинический и биохимический анализы крови, иммунохимическое исследование сыворотки крови и суточной мочи, рентгенологическое исследование костей скелета. Диагноз ММ/МГНГ устанавливали в соответствии с диагностическими критериями Международной рабочей группы по изучению множественной миеломы (The International Myeloma Working Group – IMWG) [29]. Стадирование проводили по системе Durie–Salmon [30].

У 36 больных с симптоматической ММ проводилась противоопухолевая терапия бортезомиб-содержащими курсами (VCD: бортезомиб + циклофосфан + дексаметазон, PAD: бортезомиб + адриабластин + дексаметазон). Противоопухолевый ответ оценивали по окончании индукционной терапии в соответствии с рекомендациями IMWG 2006 [31]. Стадию заболевания перед началом лечения у 16 больных оценивали как II, у 20 больных – как III стадию. 4 больных с МГНГ и вялотекущей формой ММ оставались под наблюдением без лечения.



Трек 1 Трек 2

Рис. 1. Электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции генов *c-MYC* и *HMBS* в 6% полиакриламидном геле.

Трек 1 – распределение в геле фрагментов кДНК генов *c-MYC* и *HMBS*; длина *c-MYC* 191 пар нуклеотидов, *HMBS* – 142 пары нуклеотидов; Трек 2 – результат PCR только с праймерами *c-MYC*.

Оценку экспрессии гена *c-MYC* проводили на образцах костного мозга. У больных забор материала для исследования проводили до начала какой-либо терапии, а у здоровых доноров в момент эксфузии костномозговой взвеси. Из костного мозга выделяли популяцию мононуклеаров при использовании градиента плотности фиколла (плотность 1,077 г/см³). Для получения материала, обогащенного миеломными плазмочитами, методом магнитной сепарации выделяли клетки костного мозга, экспрессирующие на своей поверхности рецептор CD138, поскольку этот иммунофенотипический маркер (синдекан 1) специфичен для плазматических клеток, являющихся биологическим субстратом ММ. Сепарация CD138⁺-клеток проводили по протоколу Miltenyi Biotec (www.miltenyibiotec.com) с помощью ручного сортера Macs с применением антител CD138 MicroBeads human (“Miltenyi Biotec”, Германия) и колонок для магнитной сепарации MACS Separation Columns (“Miltenyi Biotec”, Германия). Далее определяли процентное содержание CD138⁺-клеток в полученном клеточном пуле, который составлял 80–98% в конечном материале. Данную часть работы проводили на проточном цитометре FACS Canto II (“Beckton Dickinson”, США).

Исследовали по два образца костного мозга от каждого пациента и донора костного мозга: образец, обогащенный CD138⁺-клетками, и образец тотального материала, не прошедший сепарацию. Тотальную РНК выделяли с помощью лизиса в гуанидин-изотиоцианатном буфере с последующей экстракцией смесью фенол–хлороформ [32]. Обратную транскрипцию с целью построения кДНК проводили с помощью смеси специфичных праймеров (к исследуемому гену *c-MYC* mycRRT – cat-cga-ttt-ctt-cc и к контрольному гену «домашнего хозяйства» *HMBS* – HMBSrRT – tgt-gcc-cca-aaa-ac). Полученную к-ДНК использовали в качестве матрицы для qRT-PCR с системами праймеров: mycD – tct-tcc-cct-acc-ctc-tca-ac/mycR – ttc-ttg-ttc-ctc-ctc-aga-gtc; HMBSd – cat-gtc-cct-gcc-cag-cat-gaa/HMBSr – gct-cct-ttg-ctc-agc-aac-aa и флюоресцентными зондами: *c-MYC* – (FAM) tg-ggc-ggt-gtc-tcc-tca-tgg-(RTQ1) и *HMBS* – (ROX) cc-agg-ctg-atg-ccc-aag-ttc-t-(BHQ2). Системы праймеров предварительно проверяли на тех же матрицах с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) без зондов с последующим электрофорезом в 6% полиакриламидном геле в зависимости от их молекулярной массы показано на рис. 1, что демонстрирует возможность проведения многокомпонентной PCR.

qRT-PCR выполняли на приборе Rotor-Gene-Q. Проведение многокомпонентной PCR (Multiplex PCR) в одной пробирке позволило нивелировать разницу между исходным количеством матрицы в образцах. Уровень экспрессии гена *c-MYC* оценивали по разнице (ΔCt) между интенсивностью сигнала флюоресценции от продукта гена *HMBS* (канал

Таблица 1

Экспрессия гена *c-MYC* у здоровых доноров костного мозга

Номер образца костного мозга донора	Экспрессия гена <i>c-MYC</i>			
	в CD138 ⁺ -обогащенном материале, 2 ^{ΔCt}		в CD138 ⁺ -обогащенном материале, 2 ^{ΔCt}	
	значение в образце	среднее значение (M ± m)	значение в образце	среднее значение (M ± m)
D1	4,198	7,183 ± 1,491	2,77	1,907 ± 0,337
D2	1,658		0,57	
D3	4		3,317	
D4	11,551		1,693	
D5	7,11		1,624	
D6	6,868		0,476	
D7	16,449		2,188	
D8	4,924		3,031	
D9	7,889		1,494	

orange, ROX) и продукта гена *c-MYC* (канал green, FAM). Для сравнения результатов qRT-PCR в разных образцах, значения ΔCt были переведены в разы: 2^{ΔCt}. Полученные цифры отражают уровень экспрессии гена *c-MYC* относительно уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» *HMBS*. Таким образом, итоговое значение уровня экспрессии *c-MYC* не является абсолютным показателем. Олигонуклеотидные праймеры и флюоресцентные зонды синтезировали в ЗАО «Синтол».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы SPSS version 12 (IBM), методом Стьюдента.

Результаты

Оценить разницу (ΔCt) между экспрессией гена *c-MYC* и контрольного гена «домашнего хозяйства» *HMBS* удалось в 36 образцах, не прошедших магнитную сепарацию, и в 17 образцах, обогащенных CD138⁺-клетками. В материале, полученном от здоровых доноров, реакция qRT-PCR прошла во всех образцах и тотального, и обогащенного материала. Ограничением для получения статистически значимых результатов qRT-PCR на всех обогащенных образцах была низкая исходная клеточность полученного материала.

Среднее значение экспрессии гена *c-MYC* у 9 здоровых доноров в тотальном материале составило 1,907 ± 0,337 (2^{ΔCt}), при разбросе данных от 0,476 до 3,317 (2^{ΔCt}), в обогащенном CD138⁺-клетками – 7,183 ± 1,491 (2^{ΔCt}), разброс данных составил от 1,658 (2^{ΔCt}) до 16,449 (2^{ΔCt}) (табл. 1). На основании результатов qRT-PCR определили максимально допустимые для здоровых лиц пороговые значения экспрессии гена *c-MYC*, которые составили: для обогащенного материала 16,5 (2^{ΔCt}), для тотального материала – 3,4 (2^{ΔCt}).

У больных с МГНГ и вялотекущей миеломой, терапию которым не проводили, в материале, обогащенном CD138⁺-клетками, qRT-PCR эффективно прошла лишь в одном случае и экспрессия гена *c-MYC* была равна 10,928 (2^{ΔCt}). В тотальном материале статистически значимые результаты были получены во всех образцах, и среднее значение экспрессии гена *c-MYC* составило 7,232 ± 2,899 (2^{ΔCt}), разброс данных от 3,294 до 15,779 (2^{ΔCt}).

Таблица 2

Частота достигнутого противоопухолевого ответа у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии гена *c-MYC* в дебюте заболевания

Уровень экспрессии гена <i>c-MYC</i> в дебюте заболевания, 2ΔCt	Число больных с соответствующим уровнем экспрессии гена <i>c-MYC</i>	Среднее значение экспрессии гена <i>c-MYC</i> у больных, $M \pm m$ (min-max)	Частота достижения	
			ПО + ОХЧО + ЧО	ПО + ОХЧО
Результаты, полученные в материале, обогащенном CD138 ⁺ -клетками, 2ΔCt:				
< 16,5	4	6,876 ± 3,297 (1,265–16)	4 (100%) из 4	2 (50%) из 4
16,5–100	9	38,395 ± 5,22 (21,555–64,445)	9 (100%) из 9	4(44,4%) из 9
> 100	3	183,749 ± 37,02 (116,97–245,571)	1(33,3%) из 3	0 (0%) из 3
Результаты, полученные в тотальном материале, 2ΔCt:				
< 3,4	9	1,909 ± 0,346 (0,817–3,363)	8 (88,8%) из 9	5 (55,5%) из 9
3,4–34	19	10,179 ± 1,782 (3,58–30,484)	16 (84,2%) из 19	6 (31,5%) из 19
> 34	4	98,39 ± 27,94 (35,753–171,254)	3 (75%) из 4	2 (50%) из 4

Среди больных симптоматической ММ значения экспрессии гена *c-MYC* в образцах костного мозга, обогащенных CD138⁺-клетками, колебались в весьма широких пределах: от 1,265 (2^{ΔCt}) до 245,571 (2^{ΔCt}). В связи с этим были сформированы три группы, включающие исследованные образцы, с подпороговым значением экспрессии менее 16,5 (2^{ΔCt}), промежуточным значением – 16,5–100 (2^{ΔCt}) и гиперэкспрессией гена *c-MYC* – более 100 (2^{ΔCt}). В образцах тотального материала уровень экспрессии *c-MYC* также существенно различался: 0,817–171,254 (2^{ΔCt}). На основании результатов, полученных при работе с тотальным материалом, были сформированы аналогичные группы: с подпороговым уровнем экспрессии менее 3,4 (2^{ΔCt}), промежуточным уровнем – 3,4–34 (2^{ΔCt}) и с гиперэкспрессией гена *c-MYC* – более 34 (2^{ΔCt}).

Проведен анализ, направленный на поиск взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *c-MYC* в CD138⁺-клетках костного мозга первичных больных ММ и достигнутым противоопухолевым ответом на индукционном этапе терапии. В результате бортезомибсодержащей терапии полный ответ (ПО) был достигнут у 8 больных, очень хороший частичный ответ (ОХЧО) – у 7, частичный ответ (ЧО) – у 16, неудача терапии, свидетельствующая о резистентности опухоли, констатирована у 5 больных.

В табл. 2 представлено сопоставление показателей исходной экспрессии гена *c-MYC* с частотой достижения противоопухолевого ответа. Более четкая взаимосвязь исходной экспрессии гена *c-MYC* и степени достигнутого противоопухолевого ответа прослеживается при анализе результатов работы с материалом, обогащенным CD138⁺-клетками. ПО + ОХЧО + ЧО после индукционной терапии был получен только у тех больных, экспрессия гена *c-MYC* в момент диагностики у которых соответствовала под-

Таблица 3

Значения исходной экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ с разным противоопухолевым ответом на индукционную терапию; $M \pm m$ (min-max)

Противоопухолевый ответ на индукционную терапию	Среднее значение экспрессии гена <i>c-MYC</i> в дебюте заболевания, 2 ^{ΔCt}	
	в материале, обогащенном CD138 ⁺ -клетками (n = 16)	в тотальном материале костного мозга (n = 32)
Полный ответ	n = 3 14,259 ± 12,172 (1,265–38,585)	n = 6 5,138 ± 1,463 (0,84–11,08)
Очень хороший частичный ответ	n = 3 38,314 ± 13,1 (23,588–64,445)	n = 7 30,355 ± 16,356 (1,866–99,733)
Частичный ответ	n = 8 50,506 ± 20,624 (7,31–188,706)	n = 14 11,877 ± 3,141 (0,817–35,753)
Резистентное течение	n = 2 181,271 ± 64,3 (116,97–245,571)	n = 5 38,911 ± 33,119 (0,952–171,254)

пороговому – менее 16,5 (2^{ΔCt}) и промежуточному – 16,5–100 (2^{ΔCt}) уровню. Из 3 больных с исходной гиперэкспрессией гена *c-MYC* лишь у 1 больного был достигнут ЧО, у остальных больных из этой группы наблюдалось резистентное течение заболевания.

При анализе результатов работы с тотальным материалом столь явных различий определить не удалось.

На следующем этапе исследования было изучено, какие показатели исходной экспрессии гена *c-MYC* могли бы явиться предиктором достижения значимого противоопухолевого ответа. В табл. 3 представлены средние значения экспрессии гена *c-MYC* у больных с различным противоопухолевым ответом на проведенную индукционную терапию. Установлено, что уровень исходной экспрессии гена *c-MYC* коррелировал с глубиной противоопухолевого ответа. При анализе результатов работы с материалом, обогащенным CD138⁺-клетками, отмечено, что ПО достигался у больных, уровень экспрессии гена *c-MYC* которых не превышал показателя 38,584 (2^{ΔCt}), при среднем значении экспрессии исследуемого гена в этой группе больных 14,259 ± 12,172 (2^{ΔCt}). А ОХЧО был получен только у тех больных, уровень экспрессии гена *c-MYC* которых не превышал 64,445 (2^{ΔCt}), при средних значениях 38,314 ± 13,1 (2^{ΔCt}). У больных с более высокими показателями экспрессии гена *c-MYC* противоопухолевый ответ был менее выражен. В связи с небольшим числом больных выявленные различия оказались статистически незначимыми ($p > 0,1$).

На рис. 2, а представлена диаграмма, иллюстрирующая сопоставление средних значений экспрессии гена *c-MYC* в материале, обогащенном CD138⁺-клетками, у больных симптоматической ММ (в зависимости от полученного противоопухолевого ответа), МГНГ и вялотекущей формой ММ, а также здоровых доноров. Выявлено статистически значимое различие уровня экспрессии гена *c-MYC* между здоровыми донорами и больных ММ/МГНГ ($p = 0,01$). Помимо этого выявлена близкая к статистически значимой разница уровней экспрессии гена *c-MYC* при сравнении групп больных, достигших ПО + ОХЧО

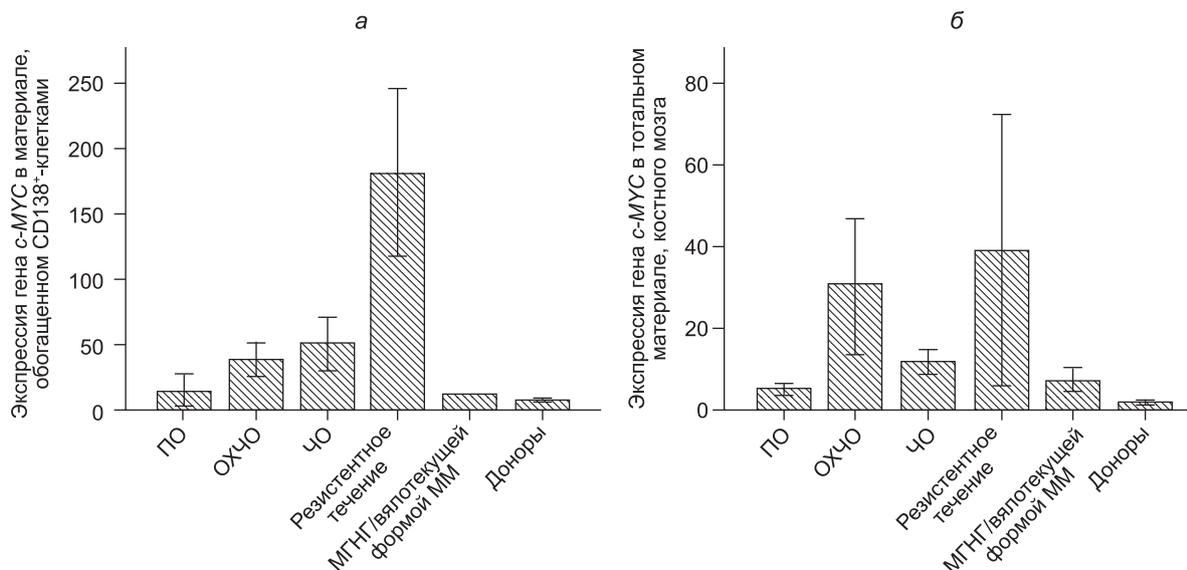


Рис. 2. Средние значения экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ при разном противоопухолевом ответе на терапию, а также у больных МГНГ/вялотекущей миеломой и здоровых доноров костного мозга.

а – данные qRT-PCR в материале, обогащенном CD138⁺-клетками; б – данные qRT-PCR в тотальном материале костного мозга.

с больными с ЧО или резистентным течением заболевания ($p = 0,09$). Вероятнее всего, на статистически значимую разницу полученных результатов повлияла малая выборка больных в каждой подгруппе.

По результатам qRT-PCR в образцах тотального материала костного мозга такой зависимости не было (рис. 2, б).

Проведенный анализ, направленный на определение взаимосвязи уровня экспрессии гена *c-MYC* со стадией заболевания на момент диагностики, не выявил какой-либо зависимости при работе как с тотальным материалом, так и с обогащенным CD138⁺-клетками.

Заключение

Результаты работы подтвердили предположение о том, что уровень экспрессии гена *c-MYC* в образцах, обогащенных CD138⁺-клетками, выше, чем в тотальном материале. Какой-либо зависимости между уровнем экспрессии гена *c-MYC* в пробах тотального материала и глубиной противоопухолевого ответа обнаружить не удалось. Между тем, при изучении показателей экспрессии гена *c-MYC* во фракции, обогащенной CD138⁺-клетками, несмотря на малую выборку, выявлена взаимосвязь между глубиной противоопухолевого ответа и уровнем экспрессии гена *c-MYC*. Полученные результаты совпадают с данными других авторов и подтверждают, что гиперэкспрессия гена *c-MYC* ассоциируется с худшим прогнозом и низкой химиочувствительностью ММ. Схожие результаты в настоящей работе были получены при условии использования методики детекции уровня экспрессии гена *c-MYC* отличной от других исследователей [20, 21, 33]. В то же время в ряде источников [3, 13, 20] можно найти данные о том, что к гиперэкспрессии гена *c-MYC* приводят хромосомные aberrации, которые свойственны преимущественно продвинутой стадиям и/или рецидивам ММ, а не дебюту заболевания.

Основываясь на представленных результатах можно сделать вывод, что для использования показателем экспрессии гена *c-MYC* в качестве предиктора противоопухолевого ответа и получения адекватной информации, необходима предварительная сепарация клеток костного мозга по поверхностному маркеру синдекан-1 (CD138⁺). Анализ показателей экспрессии гена *c-MYC*, полученных при работе с тотальным клеточным пулом, не выявил какой-либо корреляции с выраженностью противоопухолевого ответа на терапию бортезомибсодержащими курсами.

Учитывая тот факт, что гиперэкспрессия гена *c-MYC* при ММ относится к вторичным генетическим событиям, предполагалось, что имеется взаимосвязь гиперэкспрессии исследуемого гена с более поздней распространенной стадией заболевания. Однако этого явления обнаружить не удалось. По всей вероятности, отсутствие взаимосвязи гиперэкспрессии гена *c-MYC* со стадией заболевания обусловлено тем, что белок c-тус является лишь составляющей частью механизма патогенеза ММ и не может рассматриваться как единственный предиктор варианта противоопухолевого ответа.

Целью нашего исследования являлось определение уровня экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ в момент диагностики. Полученные данные сопоставляли с ответом на индукционную терапию. Выполненный этап работы не позволил оценить роль этого гена в формировании резистентности опухоли и сроков возникновения рецидива заболевания.

Несмотря на малую выборку, очевидно, что степень активности гена *c-MYC* оказывает существенное влияние на течение ММ. Для получения статистически значимых результатов необходимо расширение когорты пациентов, включенных в исследование. Кроме того, для более полного анализа роли онкогенов в патогенезе и клиническом течении ММ представляется целесообразным исследование других генов, таких как *CCND1*, *MMSET*, *K-RAS*, *N-RAS*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-02568).

ЛИТЕРАТУРА

6. Диагностика и лечение множественной миеломы. Рекомендации Британского форума по множественной миеломе и Скандинавской исследовательской группы по множественной миеломе, 2005. *Стандарты мировой медицины*. 2006; 2: 24–56.
8. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2007 г. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2009; 3: 52–90.
17. Кабилова Т.О., Черноловская Е.Л. Онкогены семейства мус как терапевтические мишени. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008; (Прил. 3): 11–26.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Paszekova H., Kryukov F., Kubiczka L., Hajek R., Sevcikova S. High-Risk Multiple Myeloma: Different definitions, different outcomes? *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014; 14(1): 24–30. doi:10.1016/j.clml.2013.09.004.
2. Bergsagel P.L., Chesi M.V. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol. Oncol*. 2013; 31(Suppl.1): 38–41. doi: 10.1002/hon.2065.
3. Morgan G.J., Walker B.A., Davies F.E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer*. 2012; 12(12): 335–48. doi: 10.1038/nrc3257.
4. Lorbach R.B., His E.D., Dogan A., Fend F. Plasma cell myeloma and related neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol*. 2011; 136(2): 168–82. doi: 10.1309/AJCPENJ68FFBRIYB.
5. Van Wier S., Braggio E., Baker A., Ahmann G., Levy J., Carpten J.D., et al. Hypodiploid multiple myeloma is characterized by more aggressive molecular markers than non-hyperdiploid multiple myeloma. *Hematologica*. 2013; 98(10): 1586–92. doi: 10.3324/haematol.2012.081083.
6. Smith A., Wisloff F., Samson D.; UK Myeloma Forum; Nordic Myeloma Study Group; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma, 2005. *Br. J. Haematol*. 2006; 132(4): 410–51.
7. Bhatia K.G., Cherney B.W., Huppi K., Magrath I.T., Cossman J., Sausville E., et al. A deletion linked to a poly (ADP-ribose) polymerase gene on chromosome 13q33-qter occurs frequently in the normal black population as well as in multiple tumor DNA. *Cancer Res*. 1990; 50(17): 5406–13.
8. Davidov M.I., Aksel E.M. The incidence of malignant neoplasms of the population of Russia and the CIS in 2007. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS (Vestnik RONC im. N.N. Blokhina)*. 2009; 20(3): 52–90. (in Russian)
9. Gonzalez G., van der Burg M., Garcia-Sanz R., Fenton J.A., Langerak A.W., Gonzalez M., et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007; 110(9): 3112–21.
10. Bergsagel P.L., Kuehl W.M., Zhan F., Sawyer J., Barlogie B., Shaughnessy J.Jr. CyclinD dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005; 106(1): 296–303.
11. Lwin T., Zhao X., Cheng F., Zhang X., Huang A., Shah B., et al. A microenvironment-mediated c-Myc/miR-548m/HDAC6 amplification loop in non-Hodgkin B cell lymphomas. *J. Clin. Invest*. 2013; 123(11): 4612–26.
12. Terunuma A., Pulturi N., Mishra P., Mathe E.A., Dorsey T.H., Yi M., et al. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J. Clin. Invest*. 2014; 124(1): 398–12. doi: 10.1172/JCI71180.
13. Affer M., Chesi M., Chen W.D., Keats J.J., Demchenko Y.N., Tamizhmani K., et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014; 28(8): 1725–35. doi: 10.1038/leu.2014.70.
14. Delgado M.D., Leon J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Gen. Cancer*. 2010; 1(6): 605–16. doi: 10.1177/1947601910377495.
15. Janz S. Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair*. 2006; 5(9–10): 1213–24.
16. Muller R., Bravo R., Burckhardt J., Curran T. Induction of c-fos gene and protein by growth factor precedes activation of c-myc. *Nature*. 1984; 312(5996): 716–20.
17. Kabilova T.O., Chernogolovskaya E.L. Myc-family oncogenes as therapeutic targets. *Bulletin of Siberian medicine (Bulletin sibirskoy meditsine)*. 2008; (Issue 3): 11–26. (in Russian)
18. Grand C.L., Powell T.J., Nagle R.B., Bearss D.J., Tye D., Gleason-Guzman M., Hurlley L.H. Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(16): 6140–5.
19. Taniguchi M., Fujiwara K., Nakai Y., Ozaki T., Koshikawa N., Toshio K., et al. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole–imidazole polyamide, which targets an E-box motif. *FEBS Open Bio*. 2014; 13(4): 328–34. doi: 10.1016/j.fob.2014.03.004.
20. Chng W.J., Huang G.F., Chung T.H., Ng S.B., Gonzalez-Paz N., Troska-Price T., et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and Newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*. 2011; 25(6): 1026–35. doi: 10.1038/leu.2011.53.
21. Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B., Bumm K., Zheng M., Tian E., et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cell. *Blood*. 2002; 99(5): 1745–57.
22. Zhan F., Barlogie B., Arzoumanian V., Huang Y., Williams D.R., Hollmig K., et al. Gene expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*. 2007; 109(4): 1692–700.
23. Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A., Keller J.L., Haddad J.Jr., Miljkovic V., et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(5): 2639–44.
24. Zhan F., Tian E., Bumm K., Smith R., Barlogie B., Shaughnessy J.Jr. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage-B-cell development. *Blood*. 2003; 101(3): 1128–40.
25. Jain M., Arvanitis C., Chu K., Dewey W., Leonhardt E., Trinh M., et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science*. 2002; 297(5578): 102–4.
26. Chesi M., Robbani D.F., Sebag M., Chng W.J., Affer M., Tiedemann R., et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell*. 2008; 13(2): 167–80. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.007.
27. Pourdehnad M., Truitt M.L., Siddiqi I.N., Ducker G.S., Shokat K.M., Ruggero D. Myc and mTOR converge on a common node in protein synthesis control that confers synthetic lethality in Myc-driven cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2): 11988–93. doi: 10.1073/pnas.1310230110.
28. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3(7): 1–12.
29. Rajkumar V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V., et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15(12): e538–48. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
30. Durie B.G., 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.
31. Durie B.G., Harousseau J.L., Miguel J.S., Blade J., Barlogie B., Anderson K., et al. International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006; 20(9): 1467–73.
32. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987; 162(1): 156–9.
33. Holien T., Vatsveen T.K., Hella H., Rampa C., Brede G., Grosseth L.A., et al. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. *Leukemia*. 2012; 26(5): 1073–80. doi: 10.1038/leu.2011.263.

Поступила 13.10.15

Принята к печати 11.12.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-006.448.03-085

Ионова Т.И.^{1,2}, Анчукова Л.В.³, Виноградова О.Ю.^{4,5,6}, Гриценко Т.А.⁷, Евсеев А.В.⁸, Козлова Л.К.⁹, Курбатова К.А.^{1,2}, Кучма Г.Б.⁹, Ломаиа Е.Г.¹⁰, Лямкина А.С.¹¹, Мачюлайтене Е.Р.¹², Мясников А.А.⁸, Никитина Т.П.^{1,2}, Панкрашкина М.М.^{4,5}, Поспелова Т.И.¹¹, Родионова А.Ю.², Усачева Е.И.¹³

КАЧЕСТВО ЖИЗНИ И СПЕКТР СИМПТОМОВ У БОЛЬНЫХ МИЕЛОФИБРОЗОМ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ: ДАННЫЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

¹ФГБУ «Санкт-Петербургский многопрофильный центр» Минздрава России, 198103, г. Санкт-Петербург, Россия; ²Международный центр исследования качества жизни, 191014, г. Санкт-Петербург, Россия; ³БУЗ «Вологодская областная клиническая больница», 160002, г. Вологда, Россия; ⁴Московский городской гематологический центр ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения Москвы, 125284, г. Москва, Россия; ⁵ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия; ⁶ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия; ⁷ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, 443099, г. Самара, Россия; ⁸ГБУЗ РК «Республиканская больница им. В.А. Баранова», 185019, г. Петрозаводск, Россия; ⁹ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г. Оренбург, Россия; ¹⁰ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», 197341, г. Санкт-Петербург, Россия; ¹¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 630087, г. Новосибирск, Россия; ¹²Поликлиника с клинико-диагностическим центром ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия; ¹³Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Целью данной работы было изучение качества жизни и спектра симптомов, а также выявление их особенностей в зависимости от вида проводимого лечения у больных миелофиброзом (МФ) в условиях реальной клинической практики. В анализ включили 93 больных МФ, которые участвовали в многоцентровом наблюдательном исследовании «Качество жизни, спектр симптомов при миелофиброзе: валидация опросника для оценки симптомов у больных миелофиброзом» (2014–2015 гг.). Из включенных в исследование 62 больных получали лучшую доступную терапию (ЛДТ, «best available treatment»), 31 больной – руксолитиниб. Больные однократно заполняли опросник оценки качества жизни SF-36, опросник для оценки симптомов у больных миелофиброзом CSP-Myelofibrosis Module и шкалу «Общая оценка изменений самочувствия пациента». В условиях реальной клинической практики продемонстрировано, что показатели физического, психологического и социального функционирования у больных МФ значительно ниже, чем у условно-здоровых респондентов; более трети больных МФ имеют значительное или критическое снижение интегрального показателя (ИП) качества жизни. На фоне терапии руксолитинибом показатели качества жизни значительно выше, а улучшение самочувствия больных существенно более выражено, чем у больных при ЛДТ. Большинство больных МФ имеют широкий спектр симптомов. Наиболее значимым симптомом, отрицательно влияющим на ИП качества жизни больных, является снижение активности. У больных МФ, получающих руксолитиниб, симптомы менее выражены, чем у больных, получающих ЛДТ. Информативность о качестве жизни и симптомах у больных МФ на фоне лечения, полученная в условиях реальной клинической практики, является важным дополнением к результатам клинических исследований при изучении клинической эффективности терапии и может способствовать улучшению контроля заболевания в соответствии с принципами риск-адаптированной терапии.

Ключевые слова: миелофиброз; качество жизни; симптомы; руксолитиниб; лучшая доступная терапия; реальная клиническая практика.

Для цитирования: Ионова Т.И., Анчукова Л.В., Виноградова О.Ю., Гриценко Т.А., Евсеев А.В., Козлова Л.К., Курбатова К.А., Кучма Г.Б., Ломаиа Е.Г., Лямкина А.С., Мачюлайтене Е.Р., Мясников А.А., Никитина Т.П., Панкрашкина М.М., Поспелова Т.И., Родионова А.Ю., Усачева Е.И. Качество жизни и спектр симптомов у больных миелофиброзом на фоне терапии: данные клинической практики. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 17-25. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-17-25

Ionova T.I.^{1,2}, Anchukova L.V.³, Vinogradova O.Yu.^{4,5,6}, Gritsenko T.A.⁷, Evseev A.V.⁸, Kozlova L.K.⁹, Kurbatova K.A.^{1,2}, Kuchma G.B.⁹, Lomaia E.G.¹⁰, Lyamkina A.S.¹¹, Machulytene E.P.¹², Myasnikov A.A.⁸, Nikitina T.P.^{1,2}, Pankrashkina M.M.^{4,5}, Pospelova T.I.¹¹, Rodionova A.Yu.², Usacheva E.I.¹³

QUALITY OF LIFE AND SYMPTOMS IN PATIENTS WITH MYELOFIBROSIS DURING THE TREATMENT: DATA OF CLINICAL PRACTICE

¹St.Petersburg Multispeciality Medical Center, St.Petersburg, 198103, Russian Federation; ²Multinational Center for Quality of Life Research, St.Petersburg, 191014, Russian Federation; ³Vologda Regional Clinical Hospital, Vologda, 160002, Russian Federation; ⁴Moscow Municipal Hematological Center, Botkin Municipal Clinical Hospital, Moscow, 125284, Russian Federation; ⁵Federal Research Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, 117997, Russian Federation; ⁶Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation; ⁷Samara State Medical University, Samara, 443099, Russian Federation; ⁸Republican Hospital named after V.A. Baranov, Petрозаводск, 185019, Russian Federation; ⁹Orenburg State Medical University, Orenburg, 460000, Russian Federation; ¹⁰Federal Almazov North-West Medical Research Center, St.Petersburg, 197341, Russian Federation; ¹¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630087, Russian Federation; ¹²Policlinic with clinical diagnostic center, Pavlov First St.Petersburg State Medical University, St.Petersburg, 197376, Russian Federation; ¹³Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation of Pavlov First St.Petersburg State Medical University, St.Petersburg, 197022, Russian Federation

The aim of the study was to evaluate the quality of life (QoL) and symptoms in patients with myelofibrosis (MF). 93 patients with MF who participated in the multicenter observational study "Quality of life and symptoms in myelofibrosis: validation of the symptom assessment tool for patients with myelofibrosis" (2014–2015) were enrolled in the analysis. 62 patients received best available treatment (BAT) and 31 patients received ruxolitinib. All the patients filled out the SF-36, CSP-Myelofibrosis Module and Patient Global Impression of Change (PGIC) tools. In the real-world study in MF patients QoL was demonstrated to be significantly worse than in healthy controls; more than one third of patients had significant or severe QoL impairment. Patients treated with ruxolitinib had better QoL and lower symptom severity as compared to BAT patients. Decline of activity appeared to be the major symptom which significantly reduced QoL in MF patients. QoL and symptom data in MF patients during treatment in a real world setting may be a solid supplement to clinical variables and may contribute to better disease control in accordance with the principles of risk-adaptive therapy.

Key words: myelofibrosis; quality of life; symptoms; ruxolitinib; best available treatment; real-world data.

For citation: Ionova T.I., Anchukova L.V., Vinogradova O. Yu., Gritsenko T.A., Evseev A.V., Kozlova L.K., Kurbatova K.A., Kuchma G.B., Lomaia E.G., Lyamkina A.S., Machulaytene E.P., Myasnikov A.A., Nikitina T.P., Pankrashkina M.M., Pospelova T.I., Rodionova A. Yu., Usacheva E.I. Quality of life and symptom profile in patients with myelofibrosis undergoing treatment: Data of clinical practice. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologia i transfusiology)*. 2016; 61(1): 17-25. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-17-25

Acknowledgments. The authors are thankful for support in data collection to the following physicians: M.A. Avtomenko (Perm), N.V. Dorofeeva (Ufa), S.N. Luneva (Arkhangelsk), G.V. Popova (Voronezh), O.D. Serdyuk (Krasnodar).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest regarding of this paper.

Funding. For the analysis there were used the data of CSP-Myelofibrosis Module questionnaire validation study which has been sponsored by the grant of "Novartis Pharma"; the analysis of data presented in the paper and preparation of the manuscript were accomplished without sponsorship.

Received 11 January 2016

Accepted 11 February 2016

Миелофиброз (МФ) – хроническое прогрессирующее злокачественное заболевание крови с неблагоприятным прогнозом, ограниченным количеством вариантов лечения, приводящее к существенному ухудшению качества жизни больного. Качество жизни больного существенно страдает за счет таких симптомов, как слабость, утомляемость, одышка, кровоточивость, боли в животе, ночная потливость, боли в костях. Терапия МФ направлена на сдерживание прогрессирования заболевания и купирование его симптомов с целью поддержания/улучшения качества жизни больных [1, 2]. В связи с этим при оценке эффекта лечения МФ одним из важных критериев эффективности, наряду с клиническими показателями, количеством госпитализаций, частотой и тяжестью осложнений, является качество жизни больного [3, 4].

До недавнего времени возможности лечения МФ были ограничены; применяемые методы терапии, включающие гемотранфузии, интерферонотерапию, цитостатическую терапию, спленэктомию, позволяли устранять симптомы заболевания, но не саму причину болезни. Единственным методом лечения МФ, который может привести к излечению, является трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Однако данная процедура сопровождается риском тяжелых осложнений, и ее проведение показано больным молодого возраста без выраженной сопутствующей патологии, что составляет незначительную популяцию больных МФ.

Значимым шагом на пути улучшения результатов лечения больных МФ явилось появление препаратов прицельного таргетного действия – ингибиторов JAK1 и JAK2 (Janus Associated Kinases). В настоящее время единственным препаратом из своей группы, официально утвержденным для лечения МФ в США, странах ЕС и России, является руксолитиниб. Данные об его эффективности у больных с первичным и вторичным МФ изучены в ряде проспективных рандомизированных исследований [5–12]. В рамках проведенных исследований, помимо оценки клинического эффекта руксолитиниба, оценивали изменение качества жизни больного и динамику симптомов [13–16]. Установлено, что применение руксолитиниба приводит к выраженному и стойкому улучшению качества жизни, повышению функциональной активности и к уменьшению симптоматики.

Наряду с зарубежными исследованиями имеются отечественные работы, в которых изучали качество жизни больных МФ [17, 18]. В этих работах оценивали качество жизни больных, получающих лучшую доступную терапию (ЛДТ, «best available treatment»), и сравнивали показатели в зависимости от вида лечения. Исследований, посвященных изучению качества жизни больных МФ, получающих руксолитиниб, в отечественной гематологии не проводили. В этой связи важным представляется анализ показателей качества жизни и симптомов у больных МФ, получающих разное лечение, включая применение руксолитиниба. Более того, целесообразно проведе-

Для корреспонденции:

Ионова Татьяна Ивановна, доктор биол. наук, профессор, Председатель совета Межнационального центра исследования качества жизни, 191014, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: tation16@gmail.com.

For correspondence:

Ionova Tatyana I., MD, PhD, DSc, Prof., Chair of Multinational Center for Quality of Life Research. St.Peterburg, 191014, Russian Federation. E-mail: tation16@gmail.com.

Information about authors:

Ionova T.I., <http://orcid.org/0000-0002-9431-5286>; Anchukova L.V., <http://orcid.org/0000-0003-2788-0784>; Vinogradova O. Yu., <http://orcid.org/0000-0002-3669-0141>; Gritsenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-2794-5122>; Evseev A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5447-6643>; Kozlova L.M., <http://orcid.org/0000-0003-4313-065X>; Kurbatova K.A., <http://orcid.org/0000-0002-1924-8757>; Kuchma G., <http://orcid.org/0000-0002-2063-8859>; Lomaia E.G., <http://orcid.org/0000-0003-3290-7961>; Lyamkina A.S., <http://orcid.org/0000-0002-2516-0778>; Machulaytene E.R., <http://orcid.org/0000-0002-4519-1010>; Myasnikov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-9346-4503>; Nikitina T.P., <http://orcid.org/0000-0002-8279-8129>; Pankrashkina M.M., <http://orcid.org/0000-0002-4819-4006>; Pospelova T.I., <http://orcid.org/0000-0002-1261-5470>; Rodionova A. Yu., <http://orcid.org/0000-0003-3546-0042>; Usacheva E.I., <http://orcid.org/0000-0001-8504-8887>.

ние исследования в условиях реальной клинической практики. Показатели качества жизни и профиль симптомов, оцененные в клинической практике (без специального отбора больных и строго соблюдения рамок протокола, при менее регулярном посещении пациентом врача и меньшей приверженности больного к лечению), могут отличаться от таковых, полученных в клинических исследованиях.

Получение данных о качестве жизни и симптомах у больных МФ на фоне лечения в условиях реальной клинической практики, а также сравнение данных показателей при разных методах лечения – важный шаг на пути улучшения качества помощи этой категории больных.

Целью данной работы было изучение качества жизни и спектра симптомов у больных первичным и вторичным МФ на фоне терапии в условиях реальной клинической практики, а также выявление их особенностей в зависимости от вида проводимого лечения. Также в рамках исследования проведен анализ эффективности и безопасности терапии МФ.

Материал и методы

В анализ включены 93 больных МФ (37 мужчин и 56 женщин) в возрасте 28–90 лет (медиана возраста 59 лет), которые участвовали в многоцентровом наблюдательном исследовании «Качество жизни, спектр симптомов при миелофиброзе: валидация опросника для оценки симптомов у больных миелофиброзом» (2014–2015 гг.). Исследование реализовано в 14 лечебных учреждениях Российской Федерации (Москва, Санкт-Петербург, Архангельск, Вологда, Воронеж, Краснодар, Новосибирск, Оренбург, Пермь, Самара, Петрозаводск, Уфа) при координации Межнационального центра исследования качества жизни. В исследование включали больных, соответствующих следующим критериям: возраст 18 лет и старше; наличие верифицированного диагноза миелофиброз – первичный или вторичный, развившийся вследствие эссенциальной тромбоцитемии или истинной полицитемии; текущая терапия МФ не менее 6 мес; согласие больного на участие в исследовании; его способность заполнить опросники; отсутствие тяжелых сопутствующих заболеваний, симптомы которых доминируют над проявлениями основного заболевания.

При включении в исследование все больные подписывали информированное согласие. Для оценки качества жизни и спектра симптомов больные заполняли стандартизированные опросники. Врачи регистрировали информацию о заболевании, лечении и побочных эффектах терапии в карте больного, разработанной в рамках исследования, и заполняли карту сопутствующей патологии. Обследование проводили однократно в условиях реальной клинической практики. Нежелательные явления (НЯ) оценивали по шкале токсичности NCI CTCAE, версия 3.0 [19].

Для оценки качества жизни и спектра симптомов использовали три опросника – опросник оценки качества жизни RAND SF-36, опросник для оценки симптомов у больных МФ – CSP-Myelofibrosis Module и шкалу «Общая оценка изменений самочувствия пациента».

Опросник RAND SF-36 является общим опросником оценки качества жизни и применяется как у здоровых людей, так и у пациентов с разными заболеваниями [20]. Опросник состоит из 36 вопросов, которые формируют 8 шкал: Физическое функционирование (ФФ), Роль физического функционирования (РФФ), Боль (Б), Общее здоровье (ОЗ), Жизнеспособность (Ж), Социальное функционирование (СФ), Роль эмоционального функционирования (РЭФ), Психическое здоровье (ПЗ). После шкалирования (перевода необ-

работанных данных в баллы качества жизни) результаты выражают в баллах от 0 до 100 по каждой из восьми шкал. Чем выше балл по шкале опросника SF-36, тем лучше показатель качества жизни. Интегральный показатель (ИП) качества жизни вычисляли методом интегральных профилей на основании шкал опросника SF-36 [21, 22]. Степень снижения ИП качества жизни больного определяли путем сравнения величины ИП качества жизни пациента со средним значением ИП качества жизни в группе условно-здоровых респондентов соответствующего пола и возраста (НИП).

Опросник для оценки симптомов у больных МФ CSP-Myelofibrosis Module предназначен для определения спектра и выраженности симптомов у больных МФ. Данный инструмент разработан на основании уже имеющихся инструментов оценки симптомов у пациентов с заболеваниями системы крови: CSP-Lymph и CSP-Leuk-CML. Опросник включает 16 симптомов: специфические симптомы МФ – боли в животе, боли в костях/мышцах, снижение аппетита, проблемы со сном, чувство перенасыщения, распираания, тяжести в животе; психологические симптомы – чувство тревоги, чувство печали, чувство страха и дополнительно потливость по ночам; симптомы, общие для онкологических заболеваний (не специфические для конкретного заболевания) – слабость, головокружение, снижение концентрации внимания, кожный зуд, снижение активности и два дополнительных симптома кашель и чувство жара/ознобы. Инструмент позволяет оценить за последнюю неделю спектр и выраженность симптомов на основании цифровых оценочных шкал (от 0 – полное отсутствие симптома до 10 – максимальная выраженность симптома, которую можно представить), а также определить суммарный балл выраженности всех симптомов, испытываемых пациентом (диапазон от 0 до 160 баллов). Суммарный балл выраженности симптомов использовали при проведении групповых сравнений. В рамках исследования «Качество жизни, спектр симптомов при миелофиброзе: валидация опросника для оценки симптомов у больных миелофиброзом» продемонстрированы удовлетворительные психометрические свойства опросника CSP-Myelofibrosis Module.

Шкала «Общая оценка изменений самочувствия пациента» (Patient Global Impression of Change, PGIC, Scale) предназначена для определения изменения самочувствия больных на фоне лечения [23]. Шкала позволяет оценить изменение самочувствия пациента с момента начала текущей терапии и включает 7 градаций изменений – «без изменений или стало хуже», «практически без изменений», «незначительно лучше», «несколько лучше», «лучше», «отчетливо лучше», «значительно лучше». Больному предлагается выбрать одну из градаций изменения самочувствия. При выборе больным градаций «без изменений или стало хуже», «практически без изменений», «незначительно лучше», «несколько лучше» его самочувствие интерпретируют как состояние без значительных изменений; градации «лучше», «отчетливо лучше» и «значительно лучше» – как улучшение самочувствия. Также в структуру данного инструмента входит цифровая оценочная шкала, на которой больному предлагается отметить цифру, соответствующую степени изменения его самочувствия с момента начала текущей терапии.

Для сравнения показателей качества жизни больных МФ с условно-здоровыми респондентами была сформирована группа из базы данных популяционного исследования, соответствующая группе больных по полу и возрасту. В группу сравнения вошли 105 человек (51 мужчина и 54 женщины) в возрасте 38–78 лет (средний возраст 51,6 года; стандартное отклонение 8,2 года).

Статистический анализ. Количественные данные представлены в виде числа наблюдений, среднего арифметического значения, стандартного отклонения, диапазона значений, медианы, межквартильного интервала и процентных долей. Качественные данные представлены в виде частот, процентных долей, 95% доверительного интервала

Таблица 1

Характеристика ответа на лечение, связанного с размером селезенки, у больных миелофиброзом в зависимости от вида проводимой терапии

Градация ответа на лечение, связанного с размером селезенки	Больные, получающие ЛДТ			Больные, получающие руксолитиниб		
	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Полностью ответили	8	12,9	5–23	15	48,4	30–66
Частично ответили	19	30,6	19–43	12	38,7	21–57
Не ответили	35	56,5	43–69	4	12,9	3–29

(95% ДИ). Для характеристики распределения анализировали данные с использованием тестов Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Выбор критерия проверки статистической значимости различий между анализируемыми показателями основывался на характере распределения данных. Оценку статистической значимости различий показателей в сравниваемых группах проводили с использованием критериев сравнения для двух выборок: *t*-критерий Стьюдента, ранговый критерий Манна–Уитни. Также использовали метод общих линейных моделей (general linear model, GLM), при этом учитывали факторы, которые могли бы влиять на показатели качества жизни. Для оценки влияния симптомов, испытываемых пациентами, на их качество жизни проведен регрессионный анализ. Анализ частот признака проводили с помощью χ^2 -критерия Пирсона. Все тесты были двусторонними, уровень статистической значимости $p < 0,05$. Статистический анализ проведен с использованием программного обеспечения SPSS 17.0 и Statistica 10.0.

Результаты

У 64 (68,8%) из 93 больных диагностирован первичный МФ, у 29 (31,2%) человек – вторичный МФ. Вторичный МФ вследствие эссенциальной тромбоцитемии развился у 14 больных, вследствие истинной полицитемии – у 15. Средняя длительность заболевания с момента постановки диагноза 86,1 мес (стандартное отклонение 69 мес, диапазон 8–281 мес). Медиана длительности текущей терапии 12 мес (межквартильный интервал: 7–25, диапазон 6–238 мес). Распределение больных по группам риска в соответствии с IPSS было следующим: 19 (20,7%) больных с низкой степенью риска, 39 (42,4%) – с промежуточной 1-й степенью риска, 19 (20,7%) – с промежуточной 2-й степенью риска, 16 (16,2%) – с высокой степенью риска. Большинство больных (76,4%) имели общесоматический статус 0–1; у 17,2% больных общесоматический статус – 2, у 6,4% – 3. Сопутствующая патология была выявлена у 46 (50%) больных. Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями были сахарный диабет без осложнений, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, почечная патология, цереброваскулярная патология, патология периферических сосудов, заболевания печени без печеночной недостаточности, хроническая обструктивная болезнь легких. 62 из 93 включенных в исследование больных получали ЛДТ, 31 пациент – руксолитиниб. Пациенты в группе ЛДТ получали следующие виды лечения – симптоматическое, цитостатическое, интерферонотерапию и спленэктомию. В группе при ЛДТ распределение по полу – 22 (35,5%) мужчины и 40 (64,5%) женщин в возрасте 35–90 лет (медиана

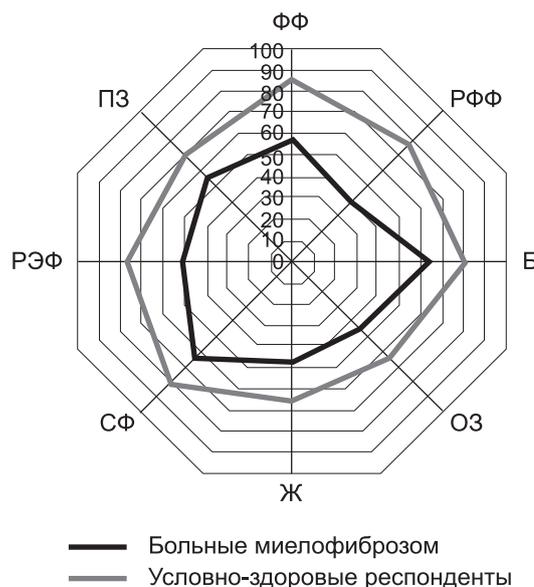


Рис. 1. Профили качества жизни у больных миелофиброзом и условно-здоровых респондентов.

возраста 60 лет; межквартильный интервал 51–68 лет). В группе лечения руксолитинибом – 15 (48%) мужчин и 16 (52%) женщин в возрасте 28–74 лет (медиана возраста 58 лет; межквартильный интервал 47–63 года). Группы были сопоставимы по полу, но различались по возрасту. Различия по возрасту были учтены при статистическом анализе.

Анализировали распределение больных согласно ответу на лечение, связанному с размером селезенки. Полностью ответившими на лечение считали больных, у которых регистрировали уменьшение размеров селезенки по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) на 35% или при пальпации на 50%; частично ответившими – больных, у которых отмечали уменьшение размеров селезенки по данным МРТ на 15–34% или при пальпации на 25–49%; не ответившими на лечение – больных, у которых не было уменьшения размеров селезенки по данным МРТ или при пальпации [13].

Распределение больных согласно ответу на лечение, связанному с размером селезенки, было следующим: полностью ответили 23 (24,7%) больных, частично ответили 31 (33,3%) больных, не ответили 39 (42%). При анализе ответов на лечение в зависимости от получаемой терапии выявлены различия в частоте ответов в группе больных, получающих ЛДТ, и в группе, получающих руксолитиниб ($p < 0,0001$).

Распределение больных согласно ответу на терапию, связанному с размером селезенки, в группах представлено в **табл. 1**. Частота полных ответов в группе больных МФ, получающих терапию руксолитинибом (48,4%), больше, чем в группе, получающих ЛДТ (12,9%) ($p < 0,0001$).

В исследуемой группе пациентов за последние 6 мес терапии МФ зарегистрированы 27 случаев НЯ у 15 (16,1%) больных, из них у 8 отмечено одно НЯ, у 4 больных – два, у 1 – три, у 2 больных – четыре. Большинство НЯ были легкой или умеренной степени тяжести. Проведен анализ НЯ у больных МФ в зависимости от проводимой терапии. В группе, полу-

чавших ЛДТ, у 7 (11,3%) больных зарегистрированы 9 случаев НЯ, из них у 5 – одно, у 2 – два НЯ. Пять случаев НЯ были 3–4-й степени тяжести: тромбоз цитозаром), анемия 3-й степени тяжести (1 случай при терапии гидреа), головная боль 3-й степени тяжести (1 случай при терапии гидреа), тошнота 3-й степени тяжести (1 случай при терапии гидреа). В группе больных, получавших руксолитиниб, у 8 (25,8%) больных отмечены 18 случаев НЯ: у 3 больных – одно НЯ, у 2 – два, у 1 – три, у 2 – четыре НЯ. Наиболее частыми НЯ были анемия (4 случая), гипокоагуляция (4 случая) и тромбоцитопения (3 случая). Большинство НЯ были 1–2-й степени тяжести, за исключением 4 случаев тяжелых НЯ (анемия 3-й степени тяжести, тромбоцитопения 3-й степени тяжести, сердцебиение 3-й степени тяжести и слабость 4-й степени тяжести).

При анализе качества жизни больных МФ изучали профили качества жизни в сравнении с профилем у условно-здоровых респондентов, а также распределение больных согласно степени снижения ИП качества жизни. Дополнительно оценивали изменение самочувствия больных на фоне лечения. На **рис. 1** представлены профили качества жизни у больных МФ и в группе сравнения. Показатели качества жизни у больных МФ существенно ниже, чем у условно-здоровых респондентов. Статистически значимые различия получены по всем шкалам SF-36 ($p < 0,0001$); максимальные различия выявлены для шкалы «ролевое физическое функционирование» – 39,8 против 76,9. Значение ИП качества жизни в группе больных МФ также значительно ниже, чем в группе сравнения: 0,3 против 0,55 ($p < 0,0001$).

Дополнительно изучили показатели качества жизни в группах больных в зависимости от проводимой терапии. В **табл. 2** представлены средние показатели качества жизни у больных МФ, получающих ЛДТ, и у больных, получающих руксолитиниб. Показатели качества жизни у больных при терапии руксолитинибом значительно выше, чем у больных при ЛДТ. Статистически значимые различия найдены для всех шкал опросника SF-36 и для ИП качества жизни.

При анализе распределения больных по степени снижения ИП качества жизни выявлено, что у 55,5% больных ИП качества жизни был снижен незначительно по сравнению с популяционной нормой (не более чем на 25%); у 11% больных – умеренно (ИП качества жизни у больных был снижен на 25–50% по сравнению с популяционной нормой); у 33,5% больных имелось значительное или критическое снижение ИП качества жизни. Таким образом, более чем у трети больных ИП качества жизни был более чем в 2 раза ниже, чем у условно-здоровых респондентов.

В группе больных при терапии руксолитинибом у 77,5% имелось незначительное снижение ИП качества жизни, у 13% – умеренное снижение ИП качества жизни, у 9,5% – значительное или критическое снижение ИП качества жизни. Больные при ЛДТ распределились следующим образом: у 44,5% – незначительное снижение ИП качества жизни, у 10% – умеренное снижение ИП качества жизни, у 45,5% –

Таблица 2

Средние показатели качества жизни у больных миелофиброзом в зависимости от вида проводимой терапии (среднее значение \pm стандартное отклонение)

Шкалы SF-36	Больные, получающие ЛДТ	Больные, получающие руксолитиниб	<i>p</i>
ФФ	51,3 \pm 28	74,7 \pm 21	< 0,0001
РФФ	32,2 \pm 40,3	61,3 \pm 44,6	0,002
Б	59,7 \pm 27,4	74,8 \pm 24,1	0,011
ОЗ	40,9 \pm 17,4	53,6 \pm 19,3	0,002
Ж	43,9 \pm 21,4	60,2 \pm 17,6	< 0,0001
СФ	58,4 \pm 23,4	81 \pm 21,4	< 0,0001
РЭФ	43 \pm 42,4	75,3 \pm 38,5	0,001
ПЗ	52,1 \pm 20,9	67 \pm 15,7	0,001
ИП качества жизни	0,24 \pm 0,21	0,47 \pm 0,25	< 0,0001

значительное или критическое снижение ИП качества жизни. Выявлено статистически значимое различие между группами больных в распределении по степеням снижения ИП качества жизни ($p = 0,002$).

При оценке изменения самочувствия больных на фоне текущей терапии на основании данных шкалы «Общая оценка изменений самочувствия пациента» обнаружено, что 48% пациентов стали чувствовать себя лучше на фоне терапии, 52% – не отметили существенных изменений или стали чувствовать себя хуже. При этом улучшение самочувствия отметили 66,7% больных в группе терапии руксолитинибом и 40% пациентов в группе при ЛДТ. Выявлено статистически значимое различие между группами больных ($p = 0,01$).

Для изучения профиля симптомов у больных МФ анализировали их встречаемость и выраженность. Данные о встречаемости симптомов представлены на **рис. 2**, из которого видно, что из 16 симптомов, представленных в опроснике CSP-Myelofibrosis Module, все симптомы, кроме кашля и кожного зуда, встречались у большинства больных. Доля больных, имевших кашель, составила 47%, кожный зуд – 42%. Наиболее выраженными были следующие симптомы: слабость (5 баллов), снижение активности (4,5 балла), специфические для МФ симптомы – боли в животе/чувство дискомфорта в животе (3,4 балла), чувство перенасыщения, распирающая и тяжести в животе (3,1 балла), психологические симптомы – чувство печали (3,1 балла), чувство тревоги (3,5 балла), проблемы со сном (4,2 балла). При анализе влияния симптомов на качество жизни установлено, что наиболее значимым симптомом, влияющим на ИП качества жизни больных, является снижение активности ($p < 0,001$, полученная модель описывает 65% дисперсии).

Дополнительно проведен сравнительный анализ встречаемости и выраженности симптомов у больных МФ в зависимости от проводимой терапии. Данные о встречаемости симптомов представлены на **рис. 3**, из которого видно, что все представленные в опроснике CSP-Myelofibrosis Module симптомы, за исключением одного (чувство перенасыщения, распирающая, тяжести в животе), встречались чаще у больных при ЛДТ. Средние показатели выраженности

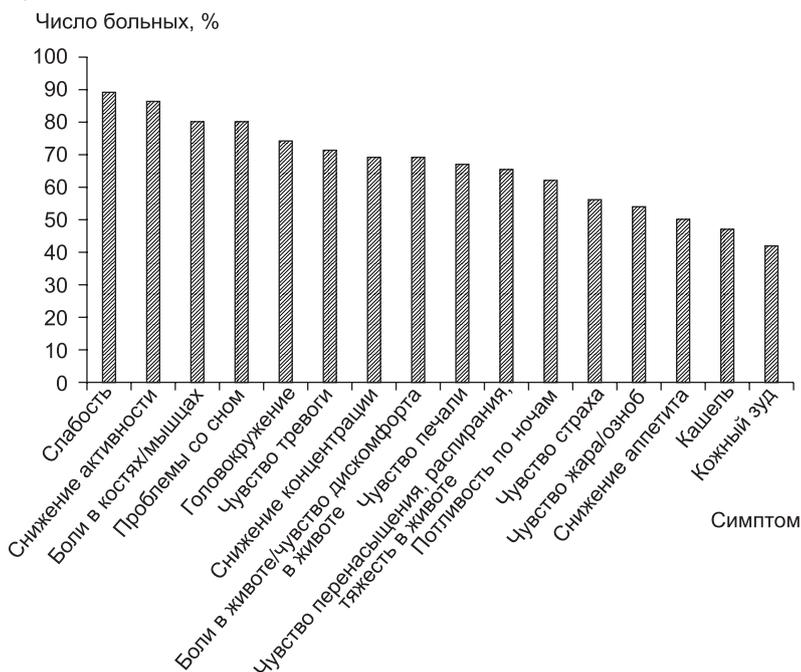


Рис. 2. Встречаемость симптомов в общей выборке больных миелофиброзом на фоне лечения.

сти симптомов в группе больных, получающих ЛДТ, и в группе, получающих руксолитиниб, представлены в **табл. 3**. У больных, получавших руксолитиниб, выраженность всех симптомов меньше, чем у больных получающих ЛДТ. Статистически значимые различия обнаружены для следующих симптомов – слабость (3,5 против 5,7 балла), головокружение (1,8 против 3,4 балла), чувство тревоги (2,3 против 4,1 балла), снижение активности (3,2 против 5,2 балла), боли в костях/мышцах (3 против 4,5 балла), проблемы со сном (2,9 против 4,8 балла),

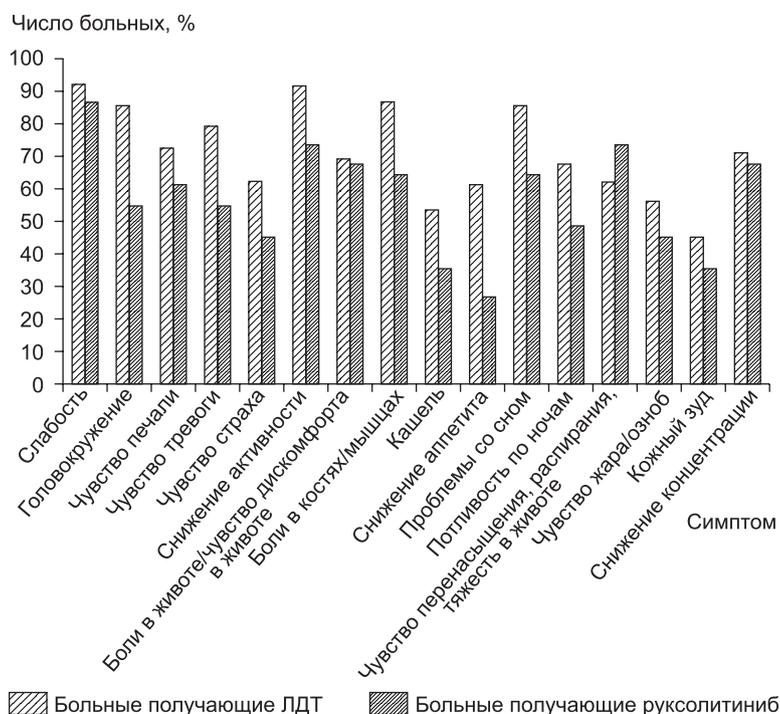


Рис. 3. Встречаемость симптомов у больных миелофиброзом в зависимости от проводимой терапии.

потливость по ночам (1,3 против 3,9 балла). Средний суммарный балл выраженности симптомов в группе больных, получавших руксолитиниб, составил 32,9 балла; в группе, получавших ЛДТ, – 54,3 балла. Выявлена выраженность симптома, оказывающего наиболее значимое влияние на качество жизни (снижение активности) была в 1,6 раза ниже в группе больных, получавших руксолитиниб, чем у больных при ЛДТ.

Обсуждение

В соответствии с современными рекомендациями по лечению МФ цель терапии заключается в следующем: контроль болезни – предупреждение прогрессии, увеличение общей и безрецидивной выживаемости; облегчение симптоматики – улучшение качества жизни больного; предупреждение осложнений (в случае беременности, хирургических операций) [1, 2]. В этой связи данные о качестве жизни и симптомах у пациента на фоне лечения являются важной дополнительной информацией при оценке эффекта и безопасности терапии МФ.

Как правило, подавляющее большинство данных о качестве жизни и симптомах у больных МФ получено в клинических исследованиях [5, 6, 13–15, 24]. Отметим, что данные клинических исследований не всегда отражают результаты лечения, полученные в реальной клинической практике. При изучении клинической эффективности терапии, ее переносимости и изменений качества жизни на фоне лечения данные наблюдательных исследований в условиях реальной клинической практики являются важным дополнением к результатам клинических исследований. Среди наблюдательных исследований, выполненных в популяции больных МФ, отметим отечественные работы, в которых описаны показатели качества жизни у больных МФ на фоне ЛДТ [17, 18]. Также заслуживает внимания недавно инициированное наблюдательное исследование Группы по изучению качества жизни при миелопролиферативных заболеваниях (MPN-QoL), основные цели которого состоят в анализе динамики качества жизни и ответа со стороны симптомов у больных МФ, получающих ЛДТ и трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток [25].

В нашем исследовании впервые в условиях реальной клинической практики РФ проведена оценка качества жизни и профиля симптомов у больных МФ, получающих разные виды лечения, в том числе, терапию руксолитинибом; выявлены их особенности в группах больных, получающих ЛДТ и терапию руксолитинибом. Руксолитиниб («Новартис Фарма», Швейцария) является первым препаратом из нового класса лекарственных средств прицельного таргетного действия, впервые обладающих способно-

стью модифицировать течение болезни; препарат зарегистрирован в России для лечения первичного, постполицитемического и посттромбоцитемического МФ, ведутся его успешные клинические испытания при истинной полицитемии и эссенциальной тромбоцитемии [1]. Следует подчеркнуть, что в международных клинических исследованиях эффективности и безопасности руксолитиниба в качестве дополнительных критериев эффективности терапии включены показатели качества жизни пациентов [4, 14–16].

Учитывая большой международный и отечественный опыт исследований качества жизни у гематологических больных, отметим, что принципиальным для получения надежных и достоверных данных по качеству жизни больных является выбор опросников. В нашей работе использовали апробированные в клинических исследованиях и клинической практике опросники RAND SF-36 для оценки качества жизни, CSP-Myelofibrosis Module для оценки симптомов и шкалу «Общая оценка изменений самочувствия пациента» для оценки изменения состояния пациента на фоне лечения. Данные о качестве жизни больных анализировали с учетом клинической информации о заболевании и лечении. Согласно полученным данным, в изучаемой выборке больных МФ получено следующее распределение пациентов по ответу на лечение, связанному с размером селезенки: полностью ответили на лечение 24,7% больных, частично – 33,3% больных, не ответили – 42%. Анализ ответов на лечение, связанных с размером селезенки, у больных в зависимости от получаемой терапии выявил, что частота полных ответов у больных, получающих терапию руксолитинибом, больше, чем в группе, получающих ЛДТ, что согласуется с данными международных клинических исследований [7, 9–12]. Частота и спектр НЯ, зарегистрированных в рамках нашей наблюдательной программы, соответствует данным опубликованных исследований [9, 10, 12]. Наиболее частыми НЯ у больных МФ, получающих руксолитиниб, были анемия, гипокоагуляция и тромбоцитопения, при этом большинство НЯ были легкой или умеренной степени тяжести. Полученные данные в целом сопоставимы с данными международных клинических исследований [10, 26, 27].

Обсуждая полученные данные о качестве жизни и симптомах у больных МФ на фоне лечения, следует обратить внимание на следующие принципиальные результаты. В целом, качество жизни у больных МФ существенно снижено по сравнению с условно-здоровыми респондентами – показатели физического, психологического и социального функционирования больных значимо ниже, чем в группе сравнения. Более трети больных МФ имеют значительное или критическое снижение ИП качества жизни, что свидетельствует о серьезных нарушениях физического, психологического и социального функционирования пациентов и их выраженной дезадаптации. При этом установлено, что на фоне терапии руксолитинибом показатели качества жизни значительно выше, а улучшение самочувствия пациентов существенно

Таблица 3

Средняя выраженность симптомов у больных миелофиброзом в зависимости от проводимой терапии (среднее значение ± стандартное отклонение)

Симптом	Больные, получающие ЛДТ	Больные, получающие руксолитиниб	<i>p</i>
Слабость	5,7 ± 2,9	3,5 ± 2,7	< 0,01
Головокружение	3,4 ± 2,7	1,8 ± 2,4	0,01
Чувство печали	3,6 ± 3,4	2,3 ± 2,7	–
Чувство тревоги	4,1 ± 3,4	2,3 ± 2,9	0,02
Чувство страха	3,1 ± 3,3	1,9 ± 2,9	–
Снижение активности	5,2 ± 3,2	3,2 ± 2,8	0,01
Боли в животе/чувство дискомфорта в животе	3,8 ± 3,6	2,6 ± 2,9	–
Боли в костях/мышцах	4,5 ± 3,2	3 ± 3	0,05
Кашель	1,4 ± 1,9	0,9 ± 1,5	–
Снижение аппетита	2,3 ± 2,8	1,3 ± 2,1	–
Проблемы со сном	4,8 ± 3,3	2,9 ± 3	0,02
Потливость по ночам	3,9 ± 3,9	1,3 ± 1,9	< 0,01
Чувство перенасыщения, распирания, тяжести в животе	3,3 ± 3,7	2,7 ± 2,7	–
Чувство жара/озноба	2,2 ± 2,9	2 ± 2,7	–
Кожный зуд	1,6 ± 1,6	0,7 ± 1	–
Снижение концентрации внимания	3,5 ± 3,4	2,4 ± 2,5	–

более выражено, чем у больных при ЛДТ. Эти данные, полученные в условиях реальной клинической практики, согласуются с результатами рандомизированных клинических исследований [14–16].

Другой важный аспект работы – изучение спектра симптомов у больных МФ на фоне терапии. В первую очередь, это связано с тем, что оценка динамики симптомов и ответа на лечение со стороны симптомов внесена в основу современной классификации критериев ответа на терапию в соответствии с консенсусными рекомендациями IWG-MRT и ELN [4]. Согласно этим рекомендациям, для оценки ответа на лечение, связанного с симптомами заболевания, предлагается использовать опросник Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF TSS), который включает 10 симптомов: усталость, снижение концентрации внимания, раннее насыщение, снижение активности, ночную потливость, зуд, боль в костях, дискомфорт в животе, потерю массы тела и лихорадку. Ответом на лечение со стороны симптомов считается снижение их выраженности на 50% и более по суммарному баллу опросника MPN-SAF TSS.

В нашем исследовании для оценки симптомов использовали опросник CSP-Myelofibrosis Module. Отметим, что в рамках исследования «Качество жизни, спектр симптомов при миелофиброзе: валидация опросника для оценки симптомов у больных миелофиброзом» проведена его валидация и продемонстрированы его удовлетворительные психометрические свойства. Также показана информативность и целесообразность его использования в реальной клинической практике в условиях РФ для оценки

основных симптомов у больных МФ, получающих разную терапию, что выгодно отличает его от других инструментов, используемых до настоящего времени для оценки симптомов в клинических исследованиях при МФ [5, 8, 10, 14, 15, 28]. Согласно полученным нами данным с использованием опросника CSP-Myelofibrosis Module, более 50% больных МФ испытывают весь спектр представленных в опроснике CSP-Myelofibrosis Module симптомов, за исключением двух симптомов (кашель и кожный зуд). Перечень наиболее выраженных и часто встречающихся симптомов у больных МФ (слабость, снижение активности, боли в животе/чувство дискомфорта в животе, чувство перенасыщения/распирания и тяжести в животе) совпадает с данными других исследований [15, 29]. Важно отметить, что в рамках данного исследования выявлен наиболее значимый симптом, негативно влияющий на ИП качества жизни больных, – снижение активности. Показано, что у больных МФ, получающих руксолитиниб, симптомы менее выражены, чем у больных при ЛДТ, что согласуется с данными литературы [14].

Таким образом, в условиях реальной клинической практики изучено качество жизни и спектр симптомов у больных первичным и вторичным МФ на фоне терапии. Показатели физического, психологического и социального функционирования у больных МФ существенно снижены. Большинство больных МФ имеют широкий спектр симптомов, наиболее выраженные и часто встречающиеся – слабость, снижение активности, боли в животе/чувство дискомфорта в животе, чувство перенасыщения/распирания и тяжести в животе, что совпадает с данными, полученными в других исследованиях. Наиболее значимым симптомом, оказывающим негативное влияние на качество жизни больных МФ, является снижение активности. На фоне терапии руксолитинибом показатели качества жизни значительно выше, а улучшение самочувствия больных существенно более выражено, чем у больных при ЛДТ. У больных МФ, получающих руксолитиниб, симптомы менее выражены, чем у больных, получающих ЛДТ.

Благодарность. Авторы статьи выражают благодарность за помощь в проведении наблюдательного исследования по валидации опросника CSP-Myelofibrosis Module специалистам-гематологам: М.А. Автоменко (ДБУЗ Клиническая медсанчасть №1, Пермь), Н.В. Дорофеевой (Городская клиническая больница №13, Уфа), С.Н. Луновой (Областная клиническая больница, Архангельск), Ж.В. Поповой (Областная клиническая больница №1, Воронеж), О.Д. Сердюк (Краевой онкологический диспансер, Краснодар).

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликта интересов, который имел бы непосредственное отношение к содержанию статьи.

Финансирование. В анализе использованы данные исследования по валидации опросника CSP-Myelofibrosis Module, выполненного при поддержке ООО «Новартис Фарма»; анализ данных, представленных в публикации, и подготовка статьи выполнены без спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меликян А.Л., Туркина А.Г., Абдулкадыров К.М., Зарицкий А.Ю., Афанасьев Б.В., Шуваев В.А. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелолипролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитозия, первичный миелофиброз). *Гематология и трансфузиология*. 2014; 4: 31–56.
17. Мещерякова Л.М., Пороткова О.В., Ковалева Л.Г., Колосова Л.Ю. Лечение и качество жизни больных первичным миелофиброзом. *Онкогематология*. 2012; 7(2): 6–13. http://www.hematology.ru/journals/oncohematology/2012/2/oncohematology_0212.pdf

18. Пороткова О.В. Лечение и качество жизни больных первичным миелофиброзом: Автореферат дис. ... канд. мед. наук. М.; 2012.
22. Новик А.А., Ионова Т.И. Интегральный показатель качества жизни – новая категория в концепции исследования качества жизни. *Вестник Межнародного центра исследования качества жизни*. 2006; 7–8: <http://www.quality-life.ru/gynstat0124.php>

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Melikyan A.L., Turkina A.G., Abdulkadyrov K.M., Zaritsky A.Yu., Afanasyev B.V., Shuvaev V.A., Lomaia E.G., Morozova E.V., Baikov V.V., Golenkov A.K., Subortseva I.N., Sokolova M.A., Kovrigina A.M., Martynkevich I.S., Gritsaev S.V., Sudarikov A.B., Sukhanova G.A., Ivanova V.L., Kaplanov K.D., Konstantinova T.S., Pospelova T.I., Ageeva T.A., Shatokhin Yu.V., Savchenko V.G. Clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative diseases (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis). *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2014; 4: 31–56. (in Russian)
2. Reilly J.T., McMullin M.F., Beer P.A., Butt N., Conneally E., Duncombe A. et al.; Writing group: British Committee for Standards in Haematology. Guideline for the diagnosis and management of myelofibrosis. *Br. J. Haematol.* 2012; 158(4): 453–71. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09179.x.
3. Novik A., Salek S., Ionova T., eds. Guidelines. Patient-Reported Outcomes in Hematology. Genoa: Forum service editore; 2012.
4. Tefferi A., Cervantes F., Mesa R., Passamonti F., Verstovsek S., Vannucchi A.M., et al. Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. *Blood*. 2013; 122(8): 1395–98. doi: 10.1182/blood-2013-03-488098.
5. Mesa R.A., Gotlib J., Gupta V., Catalano J.V., Deininger M.W., Shields A.L., et al. Effect of Ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(10): 1285–92. doi: 10.1200/JCO.2012.44.4489.
6. Yacoub A., Odenike O., Verstovsek S. Ruxolitinib: long-term management of patients with myelofibrosis and future directions in the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2014; 9(4): 350–9. doi: 10.1007/s11899-014-0229-y.
7. Cervantes F., Vannucchi A.M., Kiladjan J.J., Al-Ali H.K., Sirulnik A., Stalbovskaya V., et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood*. 2013; 122(25): 4047–53
8. Mesa R.A., Kiladjan J.J., Verstovsek S., Gotlib J., Gisslinger H., Levy R., et al. Comparison of placebo and best available therapy for the treatment of myelofibrosis in the phase 3 COMFORT studies. *Haematologica*. 2014; 99(2): 292–8.
9. Verstovsek S., Almomen A.K., Newberry K.J., Aleem A. Development of ruxolitinib as a myelofibrosis therapy. *J. Appl. Hematol.* 2013; 4(3): 89–95.
10. Verstovsek S., Mesa R.A., Gotlib J., Levy R.S., Gupta V., DiPersio J.F., et al. Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica*. 2015; 100(4): 479–88.
11. Mead A., Milojkovic D., Knapper S., Garg M., Chacko J., Farquharson M., et al. Response to ruxolitinib in patients with intermediate-1, intermediate-2 and high-risk myelofibrosis: results of the UK ROBUST trial. *Br. J. Haematol.* 2015; 170(1): 29–39.
12. Harrison C., Kiladjan J.J., Al-Ali H.K., Gisslinger H., Waltzman R., Stalbovskaya V., et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(9):787–98.
13. Mesa R.A., Kantarjian H., Tefferi A., Dueck A., Levy R., Vaddi K., et al. Evaluating the serial use of the Myelofibrosis Symptom Assessment Form for measuring symptomatic improvement: performance in 87 myelofibrosis patients on a JAK1 and JAK2

- inhibitor (INCB018424) clinical trial. *Cancer*. 2011; 117(21): 4869–77. doi: 10.1002/cncr.26129.
14. Harrison C.N., Mesa R.A., Kiladjian J.J., Al-Ali H.K., Gisslinger H., Knoops L., et al. Health-related quality of life and symptoms in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib versus best available therapy. *Br. J. Haematol.* 2013; 162(2): 229–39. doi: 10.1111/bjh.12375.
 15. Kiladjian J.J., Gisslinger H., Passamonti F., Niederwieser D., Mendelson E., Sirulnik L.A., et al. Health-related quality of life and symptom burden in patients with myelofibrosis in the COMFORT-II study. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30 (Suppl): Abstr. 6626.
 16. Vargas-Viveros P., Hurtado-Monroy R., Candelaria-Hernández M. Significant Improvement in Quality of Life (QoL) in Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasms (CMPN) and Myelofibrosis Treated with JAK-1 and JAK-2 Inhibitor Ruxolitinib. *Clin. Lymph. Myeloma Leuk.* 2014; 14 (Suppl): S155–6.
 17. Meshcheryakova L.M., Porotkova O.V., Kovaleva L.G., Kolosova L.Yu. L.M. Patients with primary myelofibrosis: treatment and quality of life. *Oncogematology. Russian journal (Onkogematologiya)*. 2012; 2: 6–13. (in Russian) http://www.hematology.ru/journals/oncohematology/2012/2/oncohematology_0212.pdf
 18. Porotkova O.V. Patients with primary myelofibrosis: treatment and quality of life. Dis. Moscow; 2012. Available at <http://medical-diss.com/docreader/539980/a#?page=1>
 19. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE 3) Version 3.0 12.12.2003. Available at: http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf
 20. Hays R.D., Sherbourne C.D., Mazel R.M. User's Manual for Medical Outcomes Study (MOS) Core measures of health-related quality of life. RAND Corporation, MR-162-RC. Available at: <http://www.rand.org>.
 21. Novik A.A., Ionova T.I., Kishtovich A.V., Tsepkova A.A., Mylnikov S.V. Stratification of patients using QoL parameters by the method of integral profiles. *Quality Life Res.* 2003; 12(7): 770.
 22. Novik A.A., Ionova T.I. Integral indicator of quality of life – a new category in the concept of quality of life research. Bulletin of the international centre for the study of quality of life. *Bulletin of the Multinational Center of Quality of Life Research. Russian journal (Vestnik Mezhnatsional'nogo tsentra issledovaniya kachestva zhizni)*. 2006; 7–8. <http://www.quality-life.ru/gymstat0124.php>
 23. Hurst H., Bolton J. Assessing the clinical significance of changes cores recorded on subjective outcome measures. *J. Manipulative Physiol. Ther.* 2004; 27(1): 26–35.
 24. Mesa R.A., Harrison C.N., Cervantes F., Dean J.P., Wang L., Granston T., et al. Relationship between Patient-Reported Outcomes (PROs) and Health-Related Quality of Life (HRQoL) and efficacy in patients with myelofibrosis in the phase III persist-1 trial of Pacritinib vs. Best Available Therapy (BAT). *Blood*. 2015; 126(23): Abstr. 1609. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/1609?sso-checked=true>
 25. Fauble V., Emanuel R.M., Geyer H.L., Dueck A.C., Kroeger N., Scott B.L., et al. Myeloproliferative Neoplasm Quality of Life (MPN-QoL) Study Group: Observational Study of quality of life and symptomatic response in myelofibrosis patients receiving undergoing treatment with conventional therapy, the measures trial and allogeneic stem cell transplant, the symptoms trial. *Blood*. 2013; 122 (21): 4090. <https://ash.confex.com/ash/2013/webprogram/Paper65062.html>
 26. Davis K.L., Côté I., Kaye J.A., Mendelson E., Gao H., Ronco J.P. Real-world assessment of clinical outcomes in lower-risk myelofibrosis patients receiving treatment with Ruxolitinib. *Adv. Hematol.* 2015; 2015. Article ID 848473. doi:10.1155/2015/848473. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/848473>
 27. Emanuel R.M., Geyer H.L., Mesa R.A. Ruxolitinib as an emerging treatment in myelofibrosis. *Blood Lymph. Cancer: Targets Ther.* 2013; 3: 11–8. <http://dx.doi.org/10.2147/BLCTT.S24926>
 28. Mesa R.A., Schwager S., Radia D., Chevillat A., Hussein K., Niblack J., et al. The Myelofibrosis Symptom Assessment Form (MFSAF): an evidence-based brief inventory to measure quality of life and symptomatic response to treatment in myelofibrosis. *Leuk. Res.* 2009; 33(9): 1199–203. doi: 10.1016/j.leukres.2009.01.035.
 29. Mitra D., Kaye J.A., Piccoro L.T., Brown J., Reith K., Mughal T.I., Sarlis N.J. Symptom burden and splenomegaly in patients with myelofibrosis in the United States: a retrospective medical record review. *Cancer Med.* 2013; 2(6): 889–98. doi: 10.1002/cam4.136.

Поступила 18.01.16

Принята к печати 11.02.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392.8-036.11-07:616.327.3-018.73-078

Клясова Г.А., Коробова А. Г., Фролова И.Н., Охмат В.А., Куликов С.М., Паровичникова Е.Н., Кравченко С.К.

ДЕТЕКЦИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ С ПРОДУКЦИЕЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ МИЕЛОИДНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ И ЛИМФОМАМИ ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ В СТАЦИОНАР

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Цель работы – изучить колонизацию слизистой оболочки кишечника и ротоглотки энтеробактериями с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) и лимфомами до курса химиотерапии. В проспективное исследование (2013–2014 гг.) были включены 98 больных (33 ОМЛ и 65 лимфомами), из них у 94 (96%) гемобластоз был диагностирован впервые. Медиана возраста больных лимфомами составила 47 лет, ОМЛ – 35 лет. У больных мазки со слизистой оболочки ротоглотки и прямой кишки брали в первые 2 дня госпитализации в Гематологическом научном центре (ГНЦ, Москва) для выявления энтеробактерий с продукцией БЛРС. Для детекции БЛРС использовали фенотипические методы для детекции генов резистентности bla_{TEM} и bla_{CTX-M} – метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). При поступлении колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС выявили у 26 (27%) больных (у 28% лимфомами, у 24% ОМЛ) и лишь у 4 (4%) – со слизистой ротоглотки; $p < 0,01$. Было выделено 34 изолята (*E. coli* 52%, *K. pneumoniae* 42%, *Citrobacter* spp. 6%). Бета-лактамазы CTX-M типа были у 76% изолятов, TEM типа – у 53%, одновременно два типа – у 44%. У больных лимфомами статистически значимыми факторами колонизации продуцентами БЛРС были перевод в ГНЦ из другого стационара (ОШ 4,2; $p = 0,01$), возраст от 50 лет и старше (ОШ 3,0; $p = 0,05$), у больных ОМЛ – проживание не в Москве (ОШ 7,6; $p = 0,04$). При многофакторном анализе независимыми оказались те же факторы. Полученные результаты ставят под сомнение назначение фторхинолонов для профилактики без предварительного обследования.

Профилактическое назначение фторхинолона будет оптимальным только для больных без колонизации кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС.

Ключевые слова: *Enterobacteriaceae*; бета-лактамазы расширенного спектра; CTX-M; TEM.

Для цитирования: Клясова Г.А., Коробова А. Г., Фролова И.Н., Охмат В.А., Куликов С.М., Паровичникова Е.Н., Кравченко С.К. Детекция энтеробактерий с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра у больных острыми миелоидными лейкозами и лимфомами при поступлении в стационар. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61 (1): 25-32. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-1-25-32

Klyasova G.A., Korobova A. G., Frolova I.N., Okhmat V.A., Kulikov S.M., Parovichnikova E.N., Kravchenko S.K.

DETECTION OF EXTENDED-SPECTRUM B-LACTAMASE PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE (ESBL-E) IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND LYMPHOMA AT ADMISSION TO THE HOSPITAL

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russia

The aim of the study was to evaluate colonization with ESBL-E of gut and oropharynx in patients with acute myeloid leukemia (AML) and lymphoma before the start of the chemotherapy. 98 patients (33 with AML and 65 with lymphoma) were included in the prospective study (2013–2014). Newly diagnosed hematological malignancies were in 94 (96%) patients. Median age of patients with lymphoma and AML was 47 and 35 years. For the first two days after admission to the hospital swabs from gut and oropharynx in patients were taken. ESBL production was confirmed by phenotypic tests, the genes *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} – by real-time PCR. Upon admission to the hospital ESBL-E colonization of gut was detected in 27% patients (28% in AML and 24% in lymphoma) and only 4% patients had ESBL-E colonization of throat, $p < 0,01$. Total of 34 of ESBL-E isolates were detected (*E. coli* 52%, *K. pneumoniae* 42%, *Citrobacter* spp. 6%). CTX-M type ESBL was detected in 76% of isolates, TEM type – in 53%, coexistence of TEM and CTX-M – in 44%. Independent risk factors for ESBL-E colonization in patients with lymphoma were transfer from another hospital (OR 4,2; $p = 0,01$) and age from 50 years and older (OR 3,0; $p = 0,05$); in patients with AML – place of living outside of Moscow (OR 7,6; $p = 0,04$). Multivariate analysis showed the same risk factors. Our results make doubtful the prescription of fluoroquinolones for prophylaxis without prior screening. Prophylaxis with fluoroquinolones may be optimal only for patients without ESBL-E colonization.

К е y w o r d s: *Enterobacteriaceae*; extended-spectrum beta-lactamase; ESBL; CTX-M; TEM.

For citation: Klyasova G.A., Korobova A. G., Frolova I.N., Okhmat V.A., Kulikov S.M., Parovichnikova E.N., Kravchenko S.K. Detection of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) among patients with acute myeloid leukemia and lymphoma upon admission to hospital. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(1): 25-32. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-1-25-32

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 11 December 2015

Accepted 11 February 2016

В настоящее время инфекционные осложнения, обусловленные энтеробактериями с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), широко распространены во всем мире. По результатам отчета ВОЗ об антибиотикорезистентности возбудителей госпитальных и внебольничных инфекций из 129 стран мира за 2014 г. отмечено, что частота обнаружения энтеробактерий с продукцией БЛРС превышает 50% в большинстве стран, причем, в Латинской Америке этот показатель составлял 71%, а в странах Юго-Восточной Азии достигал 95% [1]. Продукция БЛРС у энтеробактерий была минимальной в Канаде (до 9%) и в США (до 23%).

В 2007 г. были опубликованы результаты многоцентрового исследования 640 возбудителей сепсиса, выделенных из гемокультуры у 478 больных с опухолями системы крови, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях 7 лечебных учреждений 5 городов России с 2003 по 2005 г. [0]. Доля обнаружения микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* составила 32,4%

($n = 207$), из них с продукцией БЛРС было 36% изолятов. Продукция БЛРС определялась у 62% *Klebsiella pneumoniae* и у 36% – *Escherichia coli*. Дальнейшее накопление материала выявило увеличение количества энтеробактерий, продуцирующих БЛРС с 36% до 45% при исследовании 554 изолятов, выделенных от больных с 2003 по 2008 г. [3].

По результатам многоцентрового эпидемиологического исследования “МАРАФОН”, включающего анализ чувствительности к антибактериальным препаратам 573 изолятов *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных в 25 центрах 18 городов в России в 2011–2012 гг., продукция БЛРС была обнаружена у 78,2% изолятов, в том числе у 90,6% *K. pneumoniae* и 82,1% *E. coli* [4].

Колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС определяется чаще у больных преклонного возраста, получавших лечение антибиотиками, имевших длительный период госпитализации, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии [5, 6]. Вместе с тем

Для корреспонденции:

Клясова Галина Александровна, доктор мед. наук, профессор, заведующая научно-клинической лабораторией клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: klyasova.g@blood.ru.

For correspondence:

Galina A. Klyasova, MD, PhD, Prof., head of scientific clinical laboratory of clinical bacteriology, mycology and antibiotic therapy of National Research Center for Hematology, Moscow, 126167, Russian Federation. E-mail: klyasova.g@blood.ru.

Information about authors:

Klyasova G., <http://orcid.org/0000-0001-5973-5763>, ResearcherID: M-6329-2014; Korobova A., <http://orcid.org/0000-0002-6268-5282>, ResearcherID: M-6469-2014; Frolova I., <http://orcid.org/0000-0001-9308-9259>, ResearcherID: M-7110-2014; Okhmat V., <http://orcid.org/0000-0002-6195-4508>, ResearcherID: M-7089-2014; Kulikov S., Researcher ID: P-8020-2014; Parovichnikova E., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>.

региструются случаи колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС у людей, не применявших антибиотики и не имевших госпитализацию в стационар [7]. Полагают, что в этих случаях колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС происходит при использовании продуктов питания, содержащих подобные микроорганизмы, либо при контакте с носителями этих бактерий. Эту гипотезу подтвердили генетическими исследованиями. Так, в Нидерландах была обнаружена генетическая идентичность у БЛРС продуцирующих энтеробактерий, выделенных из образцов мяса птицы и со слизистой оболочки кишечника добровольцев [8]. Другое исследование, проведенное в Дании, также доказало возможность передачи БЛРС-штаммов человеку от домашних животных, колонизованных этими микроорганизмами [9]. Так, в 4 из 39 обследованных фермерских хозяйств были выявлены генетически идентичные энтеробактерии с продукцией БЛРС у домашних животных и у фермеров, ухаживающих за ними.

У больных гемобластозами преобладает эндогенный путь в развитии инфекционных осложнений, при котором транслокация бактерий со слизистой оболочки кишечника происходит в кровотоке. В этой связи одним из основных подходов ведения больных с гранулоцитопенией является назначение антимикробных препаратов для селективной деконтаминации кишечника с целью подавления условно-патогенной микрофлоры кишечника и предупреждения возникновения инфекции. Как правило, в этих случаях используют фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин) – препараты, проявляющие высокую активность в отношении энтеробактерий. Доказано, что профилактическое назначение фторхинолона приводило к снижению частоты эпизодов фебрильной нейтропении и случаев бактериальной инфекции [10]. В некоторых исследованиях отмечали снижение общей летальности и летальности от инфекций, но вместе с тем регистрировали увеличение доли фторхинолон-резистентных бактерий при реализации профилактики [11, 12]. Энтеробактерии с продукцией БЛРС характеризуются устойчивостью ко многим антимикробным препаратам, включая цефалоспорины III–IV поколения и фторхинолоны, и в отношении их активны лишь некоторые антибиотики – это карбапенемы и тигециклин. Инфекционные осложнения, вызванные энтеробактериями с продукцией БЛРС, характеризуются тяжелым течением, высокой летальностью и немалыми финансовыми затратами на лечение [13].

Целью нашего исследования было изучение колонизации слизистой оболочки ротоглотки и кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) и лимфомами при первой госпитализации в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (ГНЦ, Москва) до начала курса химиотерапии.

Материал и методы

Исследование было проведено с апреля 2013 г. по июнь 2014 г. в ГНЦ (Москва) и включало больных ОМЛ и лимфомами, впервые госпитализированных в ГНЦ или имевших

рецидив через 1 год и более после достижения ремиссии. У всех больных брали мазки со слизистой оболочки ротоглотки и прямой кишки в первые 2 дня госпитализации в наш центр. Мазки помещали на хромогенную селективную среду CHROMagar™ESBL («CHROMagar», Франция), предназначенную для прямого выделения энтеробактерий с продукцией БЛРС, затем инкубировали в термостате при температуре 36°C в течение 18–24 ч. Идентификацию микроорганизмов проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) на анализаторе Microflex («Bruker Daltonics», Германия).

Производство БЛРС у энтеробактерий, полученных на хромогенной селективной среде CHROMagar™ESBL, подтверждали методом «двойных дисков» и сравнением минимальной подавляющей концентрации (МПК) цефалоспоринов III поколения (цефотаксима и цефтазидим) и их комбинаций с клавулановой кислотой [14, 15]. Для внутреннего контроля качества использовали референтные штаммы *E. coli* ATCC®25922 и *K. pneumoniae* ATCC®700603.

Наличие генов резистентности *bla*_{TEM} и *bla*_{CTX-M} кодирующих наиболее распространенные бета-лактамазы, определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для этого использовали наборы реагентов для выявления генов *TEM* и *CTX-M* («Литех», Россия).

На этапе планирования исследования был разработан информационный протокол для сбора информации о пациентах. Обработку и анализ данных осуществляли с помощью процедур статистического пакета SAS v.9,13 и программы Statistica. В работе были использованы методы описательной статистики, частотного и многофакторного логистического анализа. Статистически значимыми считали различия при степени вероятности безошибочного прогноза 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты

В исследование были включены 98 больных, из них 33 (34%) больных ОМЛ и 65 (66%) больных лимфомами. Гемобластоз был впервые диагностирован у 94 (96%) пациентов, а 4 (4%) больных (1 ОМЛ и 3 лимфомами) были госпитализированы с рецидивом заболевания, возникшего через 1 год и позже после констатации ремиссии. Медиана возраста больных составила 43 года (разброс от 17 до 83 лет). Больные лимфомами были статистически значимо старшего возраста, чем больные ОМЛ (медиана 47 против 35 лет; $p = 0,01$). Среди больных ОМЛ было в 2 раза больше женщин, чем мужчин (21 женщина и 12 мужчин), а в группе больных лимфомами количество мужчин и женщин было сопоставимым (30 мужчин и 35 женщин).

При госпитализации в ГНЦ у 26 (27%) из 98 пациентов выявили колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС. Все пациенты с колонизацией БЛРС-продуцирующими штаммами были с впервые диагностированным гемобластозом. Частота обнаружения этих микроорганизмов была сопоставимой у двух групп больных и составила 28% (у 18 из 65) у больных лимфомами и 24% (у 8 из 33) – ОМЛ. Колонизация слизистой оболочки ротоглотки продуцентами БЛРС была только у 4 (4%) из 98 больных и наблюдалась статистически реже, чем со слизистой оболочки кишечника (27% против 4%; $p < 0,01$).

У 26 пациентов с колонизацией слизистой оболочки кишечника БЛРС-положительными энтеробактериями было выделено 34 штамма, в число

Таблица 1

Тип БЛРС у энтеробактерий, выделенных со слизистой оболочки кишечника больных при поступлении в ГНЦ

Тип БЛРС	Энтеробактерии с продукцией БЛРС						
	<i>E. coli</i> (n = 18)		<i>K. pneumoniae</i> (n = 14)		<i>Citrobacter</i> spp. (n = 2)	всего ... (n = 34)	
	абс.	%	абс.	%		абс.	%
ТЕМ и СТХ-М	5*	28	9*	64	1	15	44
СТХ-М	7	39	3	22	1	11	32
ТЕМ	2	11	1	7	0	3	9
Не выявлены СТХ-М и ТЕМ	4	22	1	7	0	5	15

Примечание. * $p = 0,03$

которых вошли *E. coli* (52%), *K. pneumoniae* (42%), *Citrobacter* spp. (6%). Энтеробактерии с продукцией БЛРС были обнаружены у 18 (69%) из 26 больных в монокультуре, а у 8 (31%) – в сочетании.

Бета-лактамазы СТХ-М и ТЕМ были выявлены у 85% (у 29 из 34) энтеробактерий, одновременная продукция двух типов – у 44% изолятов (табл. 1). Сочетание двух типов бета-лактамаз (СТХ-М и ТЕМ) выявляли статистически чаще у *K. pneumoniae*, чем у *E. coli* (64% против 28%; $p = 0,03$). Бета-лактамазы СТХ-М типа преобладали и были определены у 76% изолятов (у 67% *E. coli* и у 86% – *K. pneumoniae*), наличие ТЕМ типа было у 53% (у 39% *E. coli* и у 71% – *K. pneumoniae*). СТХ-М тип БЛРС у штаммов *E. coli* чаще обнаруживали в изолированном виде, чем в сочетании с ТЕМ типом (39% против 28%), а у штаммов *K. pneumoniae* – в сочетании (64% против 22%). Исследуемые типы БЛРС не были выявлены у 15% штаммов, чаще у *E. coli* (22%).

Мы провели изучение факторов, индуцирующих колонизацию слизистых кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, у всех больных и в зависимости от диагноза (табл. 2). Среди анализируемых факторов преобладало применение антибиотиков в последний месяц (80%) и пребывание в другом стационаре в течение последних 6 мес до госпитализации в ГНЦ (77%). Сопутствующие заболевания были у половины пациентов, включенных в исследова-

дование. Значительное число больных (38%) были переведены в ГНЦ из других стационаров. Статистически значимых различий в частоте регистрации изучаемых факторов у больных лимфомами и ОМЛ не найдено. Однако в группе больных ОМЛ было в 2 раза больше пациентов, переведенных из других стационаров (58% против 28%), а среди больных лимфомами преобладали пациенты старше 50 лет (42% против 21%) и имевшие сопутствующие заболевания (48% против 27%).

Далее был проведен однофакторный анализ колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемых факторов (табл. 3). Такие факторы как перевод больного из другого стационара и возраст старше 50 лет явились статистически значимыми для риска колонизации БЛРС-продуцентами. Так у больных, поступивших из других стационаров в ГНЦ, колонизация составляла 38% против 20% в случаях госпитализации больных в ГНЦ из дома (ОШ 3,1; $p = 0,01$). Вероятность колонизации была значимо выше среди больных в возрасте 50 лет и старше (38% против 20%; ОШ 2,4; $p = 0,05$). Выделение со слизистой оболочки кишечника БЛРС положительных штаммов преобладало у больных, которые были на лечении в другом стационаре в течение последних 6 мес до госпитализации в ГНЦ (31% против 13%) и проживали в сельской местности (46% против 24%).

Статистически значимыми факторами в колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных лимфомами были те же показатели, как и в общей группе больных, – это перевод в ГНЦ из другого стационара (50% против 19%; ОШ 4,2; $p = 0,01$) и возраст 50 лет и старше (40% против 18%; ОШ 3,0; $p = 0,05$). Другие показатели не оказались статистически значимыми, но выделение продуцентов БЛРС было чаще при наличии таких факторов как проживание в сельской местности, а не в городе (50% против 25%), пребывание в другом стационаре в течение последних 6 мес (34% против 14%), применение антибиотиков и наличие абдоминальной операции в течение последнего месяца до госпита-

Таблица 2

Факторы риска, индуцирующих колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, у больных ОМЛ и лимфомами

Показатель	Всего ...		Лимфома		ОМЛ	
	n	%	n	%	n	%
Общее число больных	98		65		33	
Применение антибиотиков в последний месяц до госпитализации в ГНЦ	78	80	51	78	27	82
Пребывание в другом стационаре в последние 6 мес до госпитализации в ГНЦ	75	77	44	68	31	94
Пол (мужчины)	56	58	29	45	12	36
Сопутствующие заболевания	50	51	31	48	9	27
Место жительства в других регионах, исключая Москву	48	49	29	45	19	58
Перевод из другого стационара в ГНЦ	37	38	18	28	19	58
Возраст 50 лет и старше	34	35	27	42	7	21
Проживание в сельской местности	13	13	8	12	5	15
Пребывание в реанимации до госпитализации в ГНЦ	9	9	7	11	2	6
Абдоминальные операции в последний месяц до госпитализации в ГНЦ	5	5	4	6	1	3

Таблица 3

Факторы риска колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в ГНЦ

Фактор	Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС в зависимости от анализируемого фактора		ОШ (95% ДИ)	p
	есть фактор	нет фактора		
Перевод из другого стационара	14 (38%) из 37	12 (20%) из 61	3,1 (1,23–7,82)	0,01
Возраст 50 лет и старше	13 (38%) из 34	13 (20%) из 64	2,4 (0,97–6,10)	0,05
Пребывание в другом стационаре в последние 6 мес до госпитализации в ГНЦ	23 (31%) из 75	3 (13%) из 23	2,9 (0,79–10,92)	0,09
Проживание в сельской местности	6 (46%) из 13	20 (24%) из 85	2,8 (0,84–9,25)	0,09
Абдоминальные операции в последний месяц до госпитализации в ГНЦ	2 (40%) из 5	24 (26%) из 93	1,917 (0,37–4,33)	0,71
Место жительства в других регионах, исключая Москву	15 (31%) из 48	11 (22%) из 50	1,6 (0,65–3,98)	0,29
Сопутствующие заболевания	15 (30%) из 50	11 (23%) из 48	1,4 (0,58–3,56)	0,43
Пребывание в реанимации до госпитализации в ГНЦ	3 (33%) из 9	23 (26%) из 89	1,4 (0,33–6,21)	0,24
Наличие лимфомы	18 (28%) из 65	8 (24%) из 33	1,2 (0,46–3,14)	0,71
Применение антибиотиков в последний месяц до госпитализации в ГНЦ	21 (27%) из 78	5 (25%) из 20	1,1 (0,36–3,41)	0,86

Примечание. Представлено число случаев колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС от общего числа случаев с анализируемым фактором.

лизации в ГНЦ (31% против 14% и 50% против 26% соответственно).

Статистически значимым фактором колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС продуцирующими энтеробактериями у 33 больных ОМЛ было только место жительства. Так риск колонизации БЛРС-продуцентами у больных, проживающих в других регионах, включая Московскую область, был в 7,6 раза выше, чем у жителей Москвы (37% против 7%; ОШ 7,6; $p = 0,04$). По другим анализируемым факторам не получено статистически значимых различий, но обнаружение энтеробактерий с продукцией БЛРС преобладало у пациентов, проживающих в сельской местности (40% против 21%) и переведенных из другого стационара (32% против 14%).

Проведен анализ факторов, оказывающих влияние на колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС, в число которых вошли возраст больных 50 лет и старше, поступление из другого стационара и проживание не в Москве. Возраст от 50 лет и старше и перевод из другого стационара явились независимыми факторами колонизации слизистой оболочки кишечника БЛРС положительными изолятами у всех больных и у больных лимфомами, а проживание вне Москвы – у больных ОМЛ (табл. 4).

Обсуждение

Резистентность к современным цефалоспорином, прежде всего по причине продукции БЛРС (бактерии семейства *Enterobacteriaceae*), которые входят в число наиболее частых возбудителей госпитальных инфекций, является клинически значимой проблемой. Выделяют разные типы БЛРС, среди которых преобладают СТХ-М и за последнее время произошло их быстрое распространение у энтеробактерий. Штаммы, продуцирующие ферменты этого типа, были выявлены в различных регионах мира и во многих странах, включая Россию, стали доминирующим типом БЛРС [16]. При исследовании 544 госпитальных штаммов энтеробактерий, выделенных от больных в отделениях реанимации и интенсивной

терапии различных регионов России в 1997–1998 и 2003 гг., было отмечено увеличение частоты выявления СТХ-М типа почти в 3 раза у *K. pneumonia* и *Proteus mirabilis* и почти в 8 раз у *E. coli* [17]. СТХ-М ферменты по сравнению с ТЕМ обладают большей гидролитической активностью в отношении многих бета-лактамов антибиотиков, включая цефепим. В нашем исследовании также было выявлено преобладание бета-лактамаз СТХ-М, которые были определены у 76% изолятов.

Частота детекции энтеробактерий с продукцией БЛРС у больных при поступлении в стационар варьирует в разных центрах. В публикациях представлены результаты исследований, проведенных, как правило, у больных в многопрофильном стационаре, а не у отдельной категории больных. В Нидерландах этот показатель составил 8,2%, причем отличия были несущественными среди больных, госпитализированных из дома (7,9%) и длительно получающих медицинскую помощь в реабилитационных центрах или на дому (8,6%) [18]. В исследованиях из Израиля выделение БЛРС положительных штаммов со слизистой кишечника было у 10,6–10,8% госпитализированных больных, а по результатам многоцентрового исследования, проведенного в пяти реабилитационных центрах Израиля, Франции, Испании и вклю-

Таблица 4

Факторы, оказывающие влияние на колонизацию слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в ГНЦ (многофакторный анализ)

Диагноз	Число больных	Фактор	p	ОШ (95% ДИ)
Лимфомы и ОМЛ	98	Возраст ≥ 50 лет	0,01	2,9 (1,1–7,39)
		Перевод из другого стационара	0,03	3,6 (1,3–9,6)
Лимфомы	65	Возраст ≥ 50 лет	0,01	3,7 (1,1–12,8)
		Перевод из другого стационара	0,03	5,1 (1,4–18,1)
ОМЛ	33	Место жительства в других регионах, исключая Москву	0,049	1,02 (0,99–1,04)

чающего данные о 2873 больных – 26% [19–21]. В странах Юго-Восточной Азии этот показатель был существенно выше. В работе А. Mushtaq и соавт. [22] было показано, что при поступлении в госпиталь Карачи (Пакистан) колонизацию энтеробактериями с продукцией СТХ-М-15 бета-лактамаз выявляли у 155 (88%) из 176 пациентов.

В нашем исследовании выделение энтеробактерий с продукцией БЛРС было у 27% больных ОМЛ и лимфомами. Такой высокий показатель можно объяснить тем, что 77% больных, включенных в исследование, имели госпитализацию в другие стационары, а 80% – применяли антибиотики в последний месяц до госпитализации в ГНЦ.

Значение предшествующей госпитализации в появлении колонизации слизистой кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС было отмечено и другими исследователями. В исследовании из Нидерландов, включающем 1351 пациента из четырех стационаров, было продемонстрировано, что стационарное лечение в течение последних 6 мес (ОШ 2,13) и выявление БЛРС-штаммов в течение последнего года (ОШ 11,35) были независимыми факторами в колонизации этими бактериями при поступлении в стационар [18]. Исследователями из Израиля при анализе данных у 525 пациентов были представлены четыре независимых фактора риска колонизации слизистой кишечника продуцентами БЛРС – это госпитализация в течение последнего года (69,6% против 51,4%; $p = 0,02$), пребывание в доме престарелых (32,1% против 10,9%; ОШ 2,80; $p < 0,01$), прием антибиотиков в течение последних 6 мес (72,5% против 44%; $p < 0,001$), предшествующая колонизация БЛРС положительными штаммами (21,4% против 4,7%; $p < 0,001$) [19].

Мы выявили у больных ОМЛ такой фактор риска колонизации продуцентами БЛРС как проживание вне Москвы. Можем предположить, что жителей Москвы раньше госпитализируют в стационар для реализации специализированной помощи. Среди больных ОМЛ, впервые поступивших в ГНЦ, была большая доля тех, которых перевели из другого стационара (58%) и которые имели госпитализацию в течение последних 6 мес (94%).

БЛРС обуславливают устойчивость ко всем современным цефалоспорином и стабильными к их действию могут быть лишь карбапенемы. В исследованиях *in vitro* фторхинолоны проявляют активность в отношении энтеробактерий с продукцией БЛРС, однако, показатели чувствительности ограничены и не превышают 50%. Чувствительными к ципрофлоксацину были 129 (43%) из 300 энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных от больных отделений реанимации, к левофлоксацину – 72 (49,6%) из 145 изолятов, полученных из гемокультуры больных опухолями системы крови [17, 23].

В рекомендациях первой Европейской конференции по инфекциям при лейкемии (European Conference on Infection in Leukemia, ECIL-1) профилактика фторхинолоном может быть проведена больным группами высокого риска (больные острым лейкозом, реципиенты гемопоэтических стволовых клеток) в

тех случаях, если у них ожидается гранулоцитопения длительностью от 7 дней и более после цитостатического воздействия [24]. Для профилактики фторхинолон рекомендовано применять с 1-го дня химиотерапии до завершения гранулоцитопении (нейтрофилов более $0,5 \times 10^9/\text{л}$) или назначения других антибиотиков. Эффективность профилактического применения фторхинолонов подтверждена в ряде исследований, в то же время зарегистрированы случаи суперинфекции, возникающие на фоне профилактики фторхинолоном, обусловленные фторхинолон-резистентными *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* [25]. Неэффективность фторхинолонов в лечении инфекционных осложнений, обусловленных БЛРС-положительными энтеробактериями, отмечена в клинических исследованиях. М. Tumbarello и соавт. [26] изучили факторы, оказывающие влияние на летальность 186 случаев бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*). Статистически значимыми предикторами летального исхода явились такие факторы как изначально неадекватная антимикробная терапия (ОШ 6,28; $p < 0,001$) и невыявленный первичный очаг инфекции (ОШ 2,69; $p = 0,004$) [26]. Неадекватная антимикробная терапия была проведена 89 (47,8%) из 186 пациентов, летальность в этой группе больных была статистически выше, чем у больных, кому исходно проводили адекватную терапию (59,5% против 18,5%, ОШ 2,38; $p < 0,001$). Назначение ципрофлоксацина, исходно проявляющего активность *in vitro* против выделенных микроорганизмов, было отнесено к неадекватной антимикробной терапии, приводящей к увеличению летальности (ОШ 4,05; $p < 0,001$). Полагают, что неудачи в применении ципрофлоксацина могут быть обусловлены особенностями фармакокинетики препарата, которая заключается в небольшой разнице между концентрацией в крови (или в тканях) ципрофлоксацина, используемого в стандартных дозах, и значениями минимальной подавляющей концентрации (МПК) ципрофлоксацина в отношении конкретного микроорганизма [27]. Так, в лечении инфекционных осложнений рекомендуемые терапевтические дозы ципрофлоксацина по 400 мг 2 раза в сутки будут эффективными только в отношении микроорганизмов, имеющих значения МПК ципрофлоксацина менее 0,03 мкг/мл [28]. Все вышесказанное ставит под сомнение использование фторхинолона (ципрофлоксацина, левофлоксацина, моксифлоксацина) для профилактики бактериальных инфекций у больных с колонизацией кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС.

Таким образом, наше исследование продемонстрировало, что практически у каждого третьего пациента (27%) с впервые диагностированными ОМЛ и лимфомами определялась колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в ГНЦ. Детекция их была значимо чаще со слизистой оболочки прямой кишки, чем ротоглотки. Среди энтеробактерий преобладали *E. coli* и *K. pneumoniae*, содержащие преимуще-

ственно бета-лактамазы СТХ-М. При многофакторном анализе независимыми факторами, при наличии которых вероятность колонизации БЛРС положительными бактериями статистически значимо выше, у больных лимфомами явились перевод в ГНЦ из другого стационара и возраст от 50 лет и старше, у больных ОМЛ – проживание больных вне Москвы. Полученные результаты ставят под сомнение назначение фторхинолонов для профилактики бактериальных инфекций (селективной деконтаминации кишечника) всем больным с предполагаемой гранулоцитопенией более 7 дней без предварительного обследования. Во всех случаях перед назначением фторхинолона для профилактики необходимо провести исследование со слизистой оболочки кишечника с целью выявления колонизации энтеробактериями с продукцией БЛРС и реализация профилактического назначения фторхинолона будет оптимальной только для больных без колонизации БЛРС положительными бактериями.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В., Масчан М.А., Байдильдина Д.Д., Верещагина С.А. и др. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). *Гематология и трансфузиология*. 2007; 1: 11–8.
- Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. *Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия*. 2014; 16(4): 254–65.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.21890-04). *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2004; 6(4): 306–59.
- Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2005; 7(4): 323–36.
- Клясова Г.А. Инфекции при гемобластозах и депрессия кровотока: клиника, диагностика и лечение: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2009.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- World Health Organization: Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf (accessed 25 Jan 2016).
- Klyasova G.A., Speranskaya L.L., Mironova A.V., Maschan M.A., Baydildina D.D., Vereshchagina S.A., et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromised patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2007; 1: 11–8. (in Russian)
- Klyasova G., Mironova A., Trushina E., Speranskaya L., Maschan M., Vereshchagina S., et al. Epidemiology of bacteremia in hematological patients: results of prospective multicenter study in Russia. In: *Infections in the Immuno-Compromised: Proc. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009, Sep. 12–15; San Francisco. Available at: <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=5432d6c-6288-4573-909b-5a214a7f2b24&cKey=2e122a31-68fa-4d1d-8b65-2f621c60338b&mKey={14EBFE7E-6F65-4D97-8CB6-F64F4347C38A}> (accessed 25 January 2016).
- Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Dekhnic A.V., et al. Antimicrobial Resistance of Nosocomial Enterobacteriaceae Isolates in Russia: Results of National Multicenter Surveillance Study «MARATHON» 2011–2012. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Russian journal (Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Himioterapiya)*. 2014; 16(4): 254–65. (in Russian)
- Harris A.D., McGregor J.C., Johnson J.A., Strauss S.M., Moore A.C., Standiford H.C., et al. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and intensive care unit admission. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(8): 1144–9. doi: 10.3201/eid1308.070071
- Biehl L.M., Schmidt-Hieber M., Liss B., Cornely O.A., Vehreschild M.J. Colonization and infection with extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in high-risk patients – Review of the literature from a clinical perspective. *Crit. Rev. Microbiol.* 2014. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/1040841X.2013.875515> (accessed 25 January 2016). doi:10.3109/1040841X.2013.875515
- Woerther P.L., Burdet C., Chachaty E., Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4): 744–58. doi: 10.1128/CMR.00023-13.
- Kluytmans J.A., Overvest I.T., Willemsen I., Kluytmans-van den Bergh M.F., van der Zwaluw K., Heck M., et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 56(4): 478–87. doi: 10.1093/cid/cis929.
- Hammerum A.M., Larsen J., Andersen V.D., Lester C.H., Skovgaard Skytte T.S., Hansen F., et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014; 69(10): 2650–7. doi: 10.1093/jac/dku180.
- Bucaneve G., Micozzi A., Menichetti F., Martino P., Dionisi M.S., Martinelli G., et al. Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353(10): 977–87. doi: 10.1056/NEJMoa044097.
- Gafter-Gvili A., Fraser A., Paul M., Leibovici L. Meta-analysis: antibiotic prophylaxis reduces mortality in neutropenic patients. *Ann. Intern. Med.* 2005; 142(12, Pt 1): 979–95. doi:10.7326/0003-4819-142-12_Part_1-200506210-00008.
- Kern W.V., Klose K., Jellen-Ritter A.S., Oethinger M., Bohnert J., Kern P., et al. Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* at a cancer center: epidemiologic evolution and effects of discontinuing prophylactic fluoroquinolone use in neutropenic patients with leukemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 24(2): 111–8. doi 10.1007/s10096-005-1278-x.
- Paterson D.L., Bonomo R.A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4): 657–86. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
- Guidelines for Susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Russian journal (Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Himioterapiya)*. 2004; 6(4): 306–59. (in Russian)
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. V.1.0, 2013. Available at: http://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf (Accessed 25 January 2016)
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2004; 48(1): 1–14. doi: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004
- Edelstein M.V., Stratchounski L.S. Trends in the prevalence and susceptibility of ESBL-producing Enterobacteriaceae to various antimicrobial agents in Russian ICUs. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Russian journal (Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Himioterapiya)*. 2005; 7(4): 323–36 (in Russian)
- Platteel T.N., Leverstein-van Hall M.A., Cohen Stuart J.W.,

- Thijsen S.F., Mascini E.M., van Hees B.C., et al. Predicting carriage with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria at hospital admission: a cross-sectional study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(2): 141–6. doi: 10.1016/j.cmi.2014.09.014
19. Shitrit P., Reisfeld S., Paitan Y., Gottesman B.S., Katzir M., Paul M., et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae carriage upon hospital admission: prevalence and risk factors. *J. Hosp. Infect.* 2013; 85(3): 230–2. doi: 10.1016/j.jhin.2013.07.014.
 20. Ben-Ami R., Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Schwartz D., Giladi M., Chmelnitsky I., et al. Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 42(7): 925–4.
 21. Bilavsky E., Temkin E., Lerman Y., Rabinovich A., Salomon J., Lawrence C., et al. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae on admission to rehabilitation centres. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(11): O804–10. doi: 10.1111/1469-0691.12633.
 22. Mushtaq A., Carvalho M., Chishti N., Khatoon S., Weeks J., Jehan F., et al. Frequency of carriage of New Delhi metallo beta-lactamase-1 (NDM-1) and CTX-M-15 among patients from hospitals in Karachi: preliminary data assessing risk factors for carriage and infection. In: NDM-producing bacteria: an in crescendo problem. Proc. 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013, Apr. 27–30; Berlin. Available at: https://escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/material/?mid=6957 (accessed 25 January 2016)
 23. Klyasova G. A. Infections in patients with hematological malignancies: clinical features, diagnosis and treatment. Dis. Moscow; 2009. (in Russian)
 24. Bucanevea G., Castagnolab E., Viscoli C., Leibovicid L., Menichettie F. Quinolone prophylaxis for bacterial infections in afebrile high risk neutropenic patients. *Eur. J. Cancer Suppl.* 2007; 5(2): 5–12. doi:10.1016/j.ejcsup.2007.06.002.
 25. Bow E.J. Fluoroquinolones, antimicrobial resistance and neutropenic cancer patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2011; 24(6): 545–53. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834cf054.
 26. Tumbarello M., Sanguinetti M., Montuori E., Trecarichi E.M., Posteraro B., Fiori B., et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(6): 1987–94. doi:10.1128/AAC.01509-06.
 27. Paterson D.L., Ko W.C., Von Gottberg A., Mohapatra S., Casellas J.M., Goossens H., et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39(1): 31–7. doi:10.1086/420816.
 28. Pea F., Poz D., Viale P., Pavan F., Furlanut M. Which reliable pharmacodynamics breakpoint should be advised for ciprofloxacin monotherapy in the hospital setting? A TDM-based retrospective perspective. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58(2): 380–6. doi:10.1093/jac/dkl226.

Поступила 11.12.15
Принята к печати 20.01.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.419-089. 843-06-07

Дроков М.Ю., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г.

РОЛЬ ГРАНЗИМА В В ПОПУЛЯЦИИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Роль Т-регуляторных клеток (Т-рег) в развитии аллоиммунных осложнений после трансплантации аллогенного костного мозга (алло-ТКМ) заключается в контроле избыточной реакции донорских эффекторных клеток. Основными механизмами иммунорегуляции являются: секреция цитокинов, индукция метаболических нарушений в клетках-мишенях, модификация дендритных клеток, прямой цитолитиз Т-эффекторных клеток. Одним из механизмов регуляции, который используют Т-рег, является прямой цитолитиз, основным участником которого является гранзим В. Гранзим В играет одну из ключевых ролей в поддержании «иммунологического» гомеостаза. Наши предварительные данные с качественной и количественной оценкой гранзим В-позитивных Т-рег у 30 больных после алло-ТКМ подтверждают эту роль.

Ключевые слова: трансплантация аллогенного костного мозга; гранзим В; реакция «трансплантат против хозяина»; толерантность.

Для цитирования: Дроков М.Ю., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Гальцева И.В., Васильева В.А., Михальцова Е.Д., Королева О.М., Дубняк Д.С., Савченко В.Г. Роль гранзима В в популяции Т-регуляторных клеток у больных после трансплантации аллогенного костного мозга. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(1): 32-37. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-32-37

Drokov M.Yu., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A., Galtseva I.V., Vasilieva V.A., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Savchenko V.G.

ROLE OF GRANZYME B IN T REGULATORY CELLS IN PATIENTS AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION

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

The role of regulatory T-cells (T-reg) in the development of autoimmune complications after allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT) is to control the augmented response of donor effector cells. The main mechanisms of immune regulation are the secretion of cytokines, induction of metabolic disturbances in target cells, modification of dendritic cells, direct cytolysis of T effector cells. One of the regulatory mechanisms that use T-reg is a direct cytolysis, the major mediator is granzyme B. Granzyme B plays a key role in maintaining the immune homeostasis. Preliminary data from a qualitative and quantitative assessment of granzyme B-positive T-reg in 30 patients after allo-BMT endorse this role.

Key words: transplantation of allogeneic bone marrow; granzyme B; Graft vs. Host Disease (GvHD); tolerance.

For citation: Drokov M.Yu., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A., Galtseva I.V., Vasilieva V.A., Mikhaltsova E.D., Koroleva O.M., Dubnyak D.S., Savchenko V.G. Role of granzyme B in T regulatory cells in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya).* 2016; 61(1): 32-37. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-32-37

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was supported by research topic “Development of new technologies of prevention and treatment of alloimmune complications after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation in patients with leukemia” in Hematological Research Center (Moscow).

Received 11 December 2015

Accepted 14 February 2016

В 1987 г. группа под руководством J. Tschopp [1] опубликовала данные о семействе сериновых протеаз, найденных в цитолитических гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов. Ученые смогли верифицировать восемь протеаз из этого семейства белков, исследовать их субстраты, а также определить аминокислотную последовательность. Два белка позже были получены в лаборатории R. Bleackley [2] и были названы гранзимами. На тот момент было принято считать, что белок перфорин (цитолитин) является единственным медиатором уничтожения клеток-мишеней. Поэтому открытие гранзимов привело к более глубокому пониманию феномена клеточной цитотоксичности.

Гранзим В (*син.*: гранзим 2, сериновая протеаза В, цитотоксическая клеточная протеаза 1) [3] является одной из сериновых протеаз, которая располагается в гранулах цитотоксических Т-клеток и натуральных киллеров. Намного более низкий уровень найден в моноцитах, поющих Т-клетках, В-клетках, активированных гранулоцитах и активированных моноцитах [4]. Гранзим В имеет решающее значение для быстрой индукции смерти клеток-мишеней путем апоптоза, индуцированного взаимодействием с цитотоксическими Т-клетками.

Ген, кодирующий гранзим В как у мышей, так и людей, находится на 14-й хромосоме. Он входит в состав «кластера», наряду с этим кодирующего гранзим Н, катепсин G и химазу 1 тучных клеток. У мышей данный «кластер» содержит гены, кодирующие гранзимы В, С, F, N, G, D, E, катепсин G, химазу 1 тучных клеток.

Первоначальные исследования гранзима В показали, что он обладает способностью к лизису клеток *in vitro*, способен фрагментировать ДНК и изменять конденсацию хроматина [5, 6].

Ключевой особенностью гранзима В, которая и привела к его открытию, явилась его способность расщеплять аспарагиновую кислоту. Эта специфичность к аспарагиновой кислоте является уникальной среди эукариотических сериновых протеаз.

Рецептор к гранзиму В был идентифицирован В. Мотука и соавт. [7] как манноза-6-фосфат/инсулинподобный фактор роста 2 рецептор. Ингибирование взаимодействия гранзима В и этого рецептора предотвращает эндоцитоз, а, соответственно, и индукцию апоптоза.

Гранзим В протеолитически активирует несколько каспаз, участвующих в апоптозе, включая каспазу 3 и каспазу 7 [8]. Активация предшественника ка-

спазы 7 идет посредством промежуточной активации каспазы 3, которая удаляет пропептид каспазы 7, что ведет к ее активации [9]. Также гранзим В может влиять на другие каспазы напрямую. М. Vargu и соавт. [10] показали, что гранзим В непосредственно расщепляет проапоптотический белок BID, минуя необходимость активации каспазы 8. С. Adrain и соавт. [11] продемонстрировали, что гранзим В повреждает цитоскелет путем отщепления хвостовой части С-конца α -тубулина, что в свою очередь повышает полимеризацию микротрубочек. С. Loeb и соавт. [12] также выявили, что гранзим В воздействует на белки Notch 1 и FGFR1, которые отвечают за рост и дифференцировку клеток и чье нарушение функции ведет к апоптозу.

О клиническом значении гранзима В свидетельствует тот факт, что деструкция β -островков поджелудочной железы, синтезирующих инсулин, осуществляется за счет гранзим В-зависимых механизмов, что приводит к дефициту этого гормона и развитию сахарного диабета [13]. Имеются сообщения о корреляции между количеством CD8⁺-лимфоцитов, экспрессирующих гранзим В, и активностью системной красной волчанки [14].

Несмотря на имеющиеся сведения о наличии гранзима В в популяции Т-регуляторных клеток (T-reg), не проводились исследования уровня внутриклеточного гранзима В на разных этапах после алло-ТКМ у больных гемобластомами.

Цель работы – изучение доли гранзим В⁺ Т-регуляторных клеток (T-reg) у больных после трансплантации аллогенного костного мозга (алло-ТКМ).

Материал и методы

В исследование включены 27 больных в возрасте от 18 до 60 лет (медиана возраста 39 лет), находившихся в отделении химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва).

Алло-ТКМ была выполнена от родственного или неродственного HLA-совместимого или частично совместимого донора.

У 12 больных (6 мужчин и 6 женщин) в возрасте от 22 до 60 лет (медиана возраста 42 года) до ТКМ был диагностирован острый миелобластный лейкоз (ОМЛ); у 12 больных (6 мужчин и 6 женщин) в возрасте от 18 до 58 лет (медиана возраста 27 лет) – острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), у 1 больного (женщина, 48 лет) – миелодиспластический синдром (МДС), у 2 больных (мужчины, 20 и 23 лет) – лимфомы. Вне ремиссии заболевания находились 6 (22%) из 27 больных; у 21 (78%) больного на момент начала предтрансплантационного кондиционирования была констатирована

Для корреспонденции:

Дроков Михаил Юрьевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-клинического отдела высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессии кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: mdrokov@gmail.com.

For correspondence:

Drokov Mikhail Yu., MD, PhD, Research Officer of Clinical Research Department of High-Dose Chemotherapy Hemoblastosis, Depression of Hematopoiesis and Bone Marrow Transplantation of National Research Center for Hematology. Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: mdrokov@gmail.com.

Information about authors:

Drokov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9431-8316>, Scopus Author ID 48661939800; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>; Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>, Scopus Author ID: 6506926619; Vasilieva V.A., <http://orcid.org/0000-0003-0904-7385>; Mikhaltsova E.D., <http://orcid.org/0000-0002-9372-5400>; Koroleva O.M., <http://orcid.org/0000-0001-9859-2849>; Dubnyak D.S., <http://orcid.org/0000-0002-2253-9870>; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0003-2935-4040>.

полная клинико-гематологическая ремиссия (ПР) основного заболевания.

В качестве источника трансплантата у 23 (85,2%) больных использовали гемопоэтические стволовые клетки крови от неродственного донора, у 4 (14,8%) – костный мозг от родственного донора.

Для установления диагноза и стадирования острой реакции «трансплантат против хозяина» (oРТПХ) использовали модифицированные критерии Глюксберга [15].

При определении субпопуляции Т-рег у больных после алло-ТКМ учитывали тот факт, что больные в ранние сроки после трансплантации находятся в цитопении, в том числе и лимфопении, а кроме того, для определения статистической значимости качественной оценки субпопуляции Т-лимфоцитов (определения содержания гранзима В) требуется просчет достаточно большого числа событий.

Перед проведением окраски моноклональными антителами (мкАТ) после забора венозной крови в транспортную пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в объеме 5 мл из данного объема крови методом разделения клеток в градиенте плотности с помощью фикола (плотность 1,077 г/мл), согласно стандартному протоколу, получали клетки мононуклеары. Далее проводили окраску клеточной суспензии с помощью мкАТ по стандартному протоколу фирмы “Beckton Dickinson” (США) [16].

Учитывая крайне малое число Fc-рецепторов на поверхности лимфоцитов, а также использование градиента плотности и растворов, содержащих бычий сывороточный альбумин, изотипический контроль для определения неспецифичного связывания антител не ставили.

Для определения фракции CD4⁺/CD25^{high} в пуле мононуклеарных клеток периферической крови (ПК) использовали мкАТ для поверхностных антигенов CD4 и CD25. В качестве внутреннего отрицательного контроля выступала CD4-популяция. Она была использована с целью отделить CD25^{high} популяцию CD4⁺-клеток. Стратегия гейтирования была описана ранее S. Clark и соавт. [17] и была следующей: сначала фракцию CD4⁺-клеток выделяли на точечной диаграмме SSC/CD4-APC, затем выставляли гейт на точечной диаграмме FSC/SSC для исключения клеточного дебриса и более четкой характеристики CD4⁺-лимфоцитов.

FoxP3 как маркер Т-рег не использовали, так как по современным данным FoxP3 у людей в отличие от мышей [18] не является линейноспецифическим маркером для Т-рег. Также недавно было открыто несколько его изоформ [19], что затрудняет использование анти-FoxP3 мкАТ. А тот факт что, FoxP3 может транзиторно экспрессироваться при активации клеток [20] наряду с вышеупомянутыми данными не дал возможности использовать его в качестве маркера, особенно при анализе образцов от больных с аллоиммунными осложнениями, такими как oРТПХ.

Именно эти недавние открытия в области исследования экспрессии FoxP3, который широко использовали ранее для определения Т-рег, могут быть причиной получения противоречивых данных о количестве Т-рег при развитии РТПХ у больных хроническим миелолейкозом после алло-ТКМ, когда вопреки логике уровень Т-рег повышается [21].

Определение внутриклеточного уровня гранзима В

После окрашивания поверхностных антигенов проводили окрашивание внутриклеточных антигенов – гранзима В. Окраску выполняли согласно стандартному протоколу производителя [16] для внутриклеточного окрашивания фирмы “Beckton Dickinson” (США) с использованием растворов Cytofix/Cytoperm (“Beckton Dickinson”, США).

Все полученные данные приведены в виде средних со стандартной ошибкой, в скобках указан диапазон значений. Для определения статистических различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Анализ проводили с помощью статистического программного обеспечения SPSS версии 21.0 (“SPSS Inc.”, Чикаго, Иллинойс, США).

Результаты и обсуждение

Доля гранзим В⁺ Т-рег в зависимости от диагноза до проведения ТКМ

У больных в ПР независимо от диагноза (ОМЛ или ОЛЛ) доля гранзим В⁺ клеток среди Т-рег была сопоставима с донорскими показателями и составляла $1,9 \pm 0,57\%$ (0,2–4,6) для доноров, $2,61 \pm 1,02\%$ (0,2–10,4) и $2,54 \pm 1,12\%$ (0–8,3) для больных ОЛЛ и ОМЛ в ПР. У больных же вне ремиссии, и при ОМЛ и при ОЛЛ, число гранзим В⁺ Т-рег снижено. К сожалению, анализируемые группы невелики, поэтому значимых различий не получено.

У 2 больных лимфомами в ПР доля гранзим В⁺ Т-рег одинакова в сравнении с донорами и больными острыми лейкозами в ПР и составила $1,2 \pm 0,57\%$ (0,8–1,6). Таким образом, до ТКМ у больных независимо от диагноза при отсутствии ремиссии отмечалось меньшее число гранзим В⁺-клеток среди популяции CD4⁺CD25^{high}.

Доля гранзим В⁺ Т-рег у больных после алло-ТКМ от родственного и неродственного донора

При анализе тенденций в динамике количества гранзим В⁺-клеток среди CD4⁺CD25^{high} популяции клеток у больных после ТКМ при использовании различных источников трансплантата статистически значимые различия были выявлены на ранних сроках, а именно на +30-й день после алло-ТКМ ($p = 0,04$). Доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} событий при алло-ТКМ от неродственного донора составило на +30-й день $6,23 \pm 2,46\%$ (0–30). В то время как при алло-ТКМ от родственного донора процент событий составил $12,83 \pm 4,28\%$ (6,8–18,9). В другие контрольные дни эти значения составили $12,7 \pm 7,2\%$ (2,1–22,4) для алло-ТКМ от родственного донора на +60-й день и $5,71 \pm 1,81\%$ (0–25,7) при алло-ТКМ от неродственного донора соответственно. На +90-й день доля составила $3,95 \pm 1,52\%$ (1,1–6,9) и $3,14 \pm 0,95\%$ (0–14,3) соответственно.

Учитывая, что многие иммуносупрессанты могут модулировать количество гранзим В⁺ событий, что было показано в работе [22], использование более массивной иммуносупрессивной терапии при трансплантации от неродственного донора, а именно большие дозы антиtimoцитарного глобулина (АТГ) и микрофенолата мофетил, которые напрямую действуют на Т-клеточное звено иммунной системы, может объяснить факт заметно более низкой доли гранзим В⁺-клеток в CD4⁺CD25^{high} популяции на +30-й день после алло-ТКМ при трансплантации от неродственного донора.

Доля гранзим В⁺ Т-рег у больных после алло-ТКМ с кондиционированием в миелоаблативном режиме и режиме пониженной интенсивности

С момента внедрения алло-ТКМ в клиническую практику считается, что ее выполнение невозможно без проведения предварительного предтрансплантационного кондиционирования, целью которого является как миело-, так и иммуносупрессия. В настоящее время режимы кондиционирования подразделяют на три основные группы: миелоаблативные, немиелоаблативные и режимы пониженной интенсивности/токсичности.

По мнению экспертов International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) [23], любой режим кондиционирования, который включает дозу тотального облучения менее 500 сГр (единовременно) или менее 800 сГр фракционированно, бусульфан в дозе менее 9 мг/кг, мелфалан менее 140 мг/м², тиотепа менее 10 мг/кг, можно отнести к режимам пониженной интенсивности.

На первых этапах своего становления трансплантацию применяли лишь в качестве терапии спасения при рефрактерных опухолях, и именно миелоаблативные режимы до недавнего времени использовали при ТКМ. Трансплантацию без кондиционирования до недавнего времени выполняли лишь детям с врожденными иммунодефицитами, в настоящее время ее широко используют лишь в детской трансплантологии [24–25]. Ранее мы описали [26] проведение алло-ТКМ без предварительного предтрансплантационного кондиционирования у взрослого больного гемобластомой.

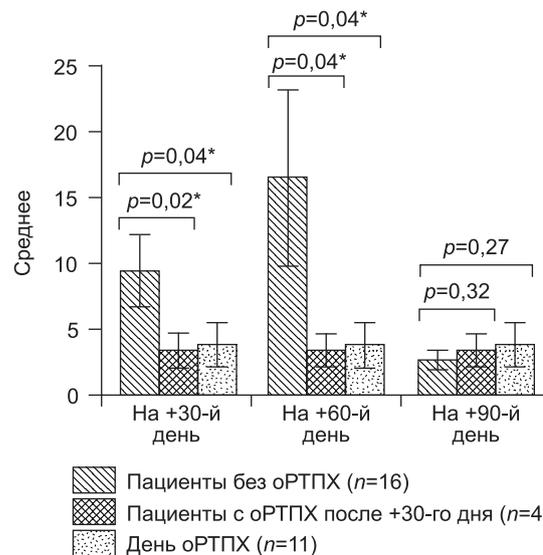
В данном исследовании миелоаблативное кондиционирование (МАК) выполнили 10 больным, режим пониженной интенсивности (РИС) – 17 больным. Показанием для использования режима МАК был молодой возраст до 45 лет, а также отсутствие серьезной сопутствующей патологии в анамнезе (грибковая инфекция, алло- или ауто-ТКМ в анамнезе). В остальных случаях использовали режим пониженной интенсивности. У больных вне ремиссии, при наличии бластных клеток в костном мозге более 5%, использовали протокол FLAMSA (модифицированная).

При анализе данных, полученных у больных, получивших различные режимы кондиционирования, различия в доле гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} не выявлено. Для МАК доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} клеток составила 5,37 ± 2,31% (0–18,9), 4,98 ± 2,74% (0–22,4), 3,49 ± 1,21% (0–9,9) против 6,87 ± 2,61% (0–30), 13,69 ± 6,62% (0–97,9), 3,15 ± 1,14% (0,2–14,3) в случае РИС на +30,+60 и +90-й день соответственно.

Доля гранзим В⁺ Т-рег у больных после алло-ТКМ, у которых диагностирована оРТПХ

Чтобы оценить роль экспрессии гранзима В в различных клетках в момент развития оРТПХ, использовали метод "landmark"-анализа. В 1-ю группу больных (n = 16) «без оРТПХ» включили всех пациентов независимо от диагноза и режима кондиционирования, у которых с 0 до +90-го дня не было констатировано развития оРТПХ. Во 2-ю группу (n = 4) были включены больные, у которых оРТПХ развилась на более чем +30-й день, из них у 2 – после 60-го дня и у 2 – более чем на +60-й день. У 7 больных оРТПХ развилась до +30-го дня, так как у них время оценки популяции было в день диагностики оРТПХ, а в контрольные сроки (на +30,+60 и +90-й день) у всех этих пациентов была эскалирована иммуносупрессивная терапия.

Доля гранзим В⁺-клеток в популяции CD4⁺CD25^{high} в 1-й группе была более высокой на +30 и +60-й день (см. рисунок) при отсутствии оРТПХ за время наблюдения и по сравнению со 2-й группой больных с развившейся оРТПХ в период с 30-го по 90-й день.



Доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток на +30, +60 и +90-й день после алло-ТКМ у больных без оРТПХ за период наблюдения, больных, у которых она разовьется после +30-го дня, а также в день констатации оРТПХ (среднее значение ± стандартная ошибка).

Доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high} событий у больных без оРТПХ (1-я группа) составила 9,49 ± 2,79% (0–30) и 16,56 ± 6,98% (0–97,9) на +30-й и +60-й дни, что было значимо выше, чем во 2-й группе с оРТПХ (p = 0,02), развившейся после +30-го дня – 3,38 ± 1,47% (0–6,1). Этот факт позволяет предполагать вероятность развития оРТПХ при обследовании в контрольные сроки, что открывает перспективу проведения превентивной терапии оРТПХ.

Была исследована доля гранзим В⁺ Т-рег и у больных, у которых развилась оРТПХ до 30-го дня (первой контрольной точки после ТКМ), и этот показатель измеряли в день развития оРТПХ (3-я группа). Он составил 3,8 ± 1,78% (0–16,8). Этот показатель был значимо ниже показателей в контрольные сроки (+30-й день) у больных из 1-й группы, у которых оРТПХ вообще не развилась (p = 0,04) (см. рисунок). В целом, доля гранзим В⁺ клеток в CD4⁺CD25^{high}-клетках в день развития РТПХ у всех 11 больных (медиана 26 день) была существенно ниже в сравнении с показателями на +30-й и +60-й дни в 1-й группе. Различия в доле клеток являлись значимыми. Доля гранзим В⁺ Т-рег составила 3,8 ± 1,78% (0–16,8) в день развития оРТПХ и 9,49 ± 2,79% (0–30) на +30-й день и 16,56 ± 6,98% (0–97,9) на +60-й день у больных из 1-й группы. К +90-му дню данные различия становились незначимыми. Это объясняет тот факт, что развитие оРТПХ после +100-го дня, так называемой «поздней» оРТПХ, является редким событием. По-видимому, приобретение достаточного контроля со стороны Т-рег над эффекторной популяцией приводит к резкому снижению частоты оРТПХ после +100-го дня.

Все эти данные также подтверждаются полученными результатами, в которых доля гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток служила предиктором развития оРТПХ, и его более низкий уровень задолго до развития оРТПХ свидетельствовал о развитии оРТПХ в будущем.

Таким образом, у больных после алло-ТКМ малое количество гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток определяет высокую вероятность развития оРТПХ. Или наоборот, чем больше было количество гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток, тем меньше была вероятность развития оРТПХ в будущем, а своего минимального значения этот показатель достигал в день установления диагноза оРТПХ.

Таким образом, регуляция Т-клеточного звена иммунной системы представляет собой сложнейший каскад, состоящий как из клеточных, так и гуморальных механизмов. Гранзим В в субпопуляции Т-рег играет важную роль в процессе регуляции иммунного ответа и модулировании оРТПХ после алло-ТКМ. Возможность оценить эти механизмы регуляции и позволяет определить степень значимости этого фактора и использовать его в качестве возможного предиктора в развитии оРТПХ.

Эта работа является первой, посвященной изучению экспрессии гранзима В в Т-рег у больных после алло-ТКМ. Полученные нами результаты совпадают с экспериментальными данными, представленными в публикациях [27], и подтверждают, что гранзим В является важным участником регуляции РТПХ в моделях алло-ТКМ. Следует учитывать и то, что Т-рег являются одним из главных компонентов, обеспечивающих периферическую толерантность за счет делеции аллореактивных клонов [28]. Поэтому небольшое число клеток с гранзимом В среди популяции Т-рег, у которых впоследствии развилась оРТПХ, представляется вполне логичным. Более высокое содержание гранзима В позволяет Т-рег ограничивать популяцию цитотоксических лимфоцитов, которые участвуют не только в противоопухолевом и противовирусном звене иммунной системы [28], но и являются эффекторным звеном оРТПХ [28].

Проведенный анализ результатов показал, что доля экспрессирующих гранзим В-клеток в популяции CD4⁺CD25^{high} была более высокой на всех контрольных сроках (на +30-й и +60-й дни) при отсутствии РТПХ за время наблюдения в сравнении с долей таких же клеток в день развития оРТПХ, а также в сравнении с долей гранзим В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток у больных у которых оРТПХ разовьется после +30-го дня (см. рисунок).

Несмотря на малую выборку, очевидно, что гранзим В оказывает существенное влияние на развитие оРТПХ. Таким образом, выявленные изменения свидетельствуют о необходимости продолжения целенаправленного изучения роли количественных соотношений гранзима В⁺ CD4⁺CD25^{high}-клеток в качестве маркера-предиктора развития оРТПХ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было выполнено в рамках темы НИР «Разработка новых технологий профилактики и лечения аллоиммунных осложнений после трансплантации аллогенных стволовых гемопоэтических клеток у больных с лейкозами» в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва).

ЛИТЕРАТУРА

26. Дроков М.Ю., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А., Васильева В.А., Урнова Е.С., Троицкая В.В. и др. Трансплантация аллогенного костного мозга без проведения предтрансплантационного кондиционирования с использованием циклофосфамида и мезенхимальных стромальных клеток в качестве

индукции толерантности. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 1: 42–6.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Masson D., Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell*. 1987; 49(5): 679–85.
2. Lobe C.G., Finlay B.B., Paranchych W., Paetkau V.H., Bleackley R.C. Novel serine proteases encoded by two cytotoxic T lymphocyte-specific genes. *Science*. 1986; 232(4752): 858–61.
3. Trapani J.A., Browne K.A., Dawson M., Smyth M.J. Immunopurification of functional Asp-ase (Natural Killer cell Granzyme B) using a monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 195(2): 910–20.
4. Rissoan M.C., Duhon T., Bridon J.M., Bendriss-Vermare N., Péronne C., de Saint Vis B., et al. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2002; 100(9): 3295–303.
5. Heibei J.A., Barry M., Motyka B., Bleackley R.C. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential (Delta Psi m) and cytochrome c release are caspase independent. *J. Immunol.* 1999; 163(9): 4683–93.
6. Shi L., Kraut R.P., Aebersold R., Greenberg A.H. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* 1992; 175(2): 553–66.
7. Motyka B., Korbitt G., Pinkoski M.J., Heibei J.A., Caputo A., Hobman M., et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*. 2000; 103(3): 491–500.
8. Chinnaiyan A.M., Hanna W.L., Orth K., Duan H., Poirier G.G., Froelich C.J., et al. Cytotoxic T-cell-derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3. *Curr. Biol.* 1996; 6(7): 897–9.
9. Yang X., Stennicke H.R., Wang B., Green D.R., Jänicke R.U., Srinivasan A., et al. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(51): 34278–83.
10. Barry M., Heibei J.A., Pinkoski M.J., Lee S.F., Moyer R.W., Green D.R., et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving. *Bid. Mol. Cell Biol.* 2000; 20(11): 3781–94.
11. Adrain C., Duriez P.J., Brumatti G., Delivani P., Martin S.J. The cytotoxic lymphocyte protease, granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(12): 8118–25.
12. Loeb C.R.K., Harris J.L., Craik C.S. Granzyme B proteolyzes receptors important to proliferation and survival, tipping the balance toward apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(38): 28326–35.
13. Thomas H.E., Trapani J.A., Kay T.W.H. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ.* 2010; 17(4): 577–85.
14. Blanco P., Pitard V., Viallard J.F., Taupin J.L., Pellegrin J.L., Moreau J.F. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* 2005; 52(1): 201–11.
15. Przepiorka D., Weisdorf D., Martin P., Klingemann H.G., Beatty P., Hows J., Thomas E.D. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15(6): 825–8.
16. Andersson J., Abrams J., Björk L., Funa K., Litton M., Agren K., et al. Concomitant in vivo production of 19 different cytokines in human tonsils. *Immunology* 1994; 83(1): 16–24.
17. Clarke S.L., Betts G.J., Plant A., Wright K.L., El-Shanawany T.M., Harrop R., et al. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2006; 1(1): 2–7.
18. Ziegler S.F. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(1): 21–3.
19. Allan S.E., Passerini L., Bacchetta R., Crellin N., Dai M., Orban P.C., et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(11): 3276–84.
20. Wang J., Ioan-Facsinay A., van der Voort E.I.H., Huizinga T.W.J., Toes R.E.M. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(1): 129–38.
21. Beres A.J., Drobyski W.R. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front. Immunol.* 2013; 4: 163. doi: 10.3389/fimmu.2013.00163

22. Efimova O.V., Kelley T.W. Induction of granzyme B expression in T-cell receptor/CD28-stimulated human regulatory T cells is suppressed by inhibitors of the PI3K-mTOR pathway. *BMC Immunol.* 2009; 10: 59.
23. Maziarz R.T., Slater S., eds. *Blood and Marrow Transplant Handbook*. New York: Springer; 2011.
24. Cancrini C., Ferrua F., Scarselli A., Brigida I., Romiti M.L., Barera G., et al. Role of reduced intensity conditioning in T-cell and B-cell immune reconstitution after HLA-identical bone marrow transplantation in ADA-SCID. *Haematologica.* 2010; 95(10): 1778–82
25. Gaspar H.B., Aiuti A., Porta F., Candotti F., Hershfield M.S., Notarangelo L.D. How I treat ADA deficiency. *Blood.* 2009; 114(17): 3524–32.
26. Drovok M.Yu., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A., Vasileva V.A., Urnova E.S., Troitskaya V.V., et al. Allogenic bone marrow transplantation without pretransplantation conditioning and tolerance induction by cyclophosphamide and mesenchymal stromal cells. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya).* 2014; 1: 42–6. (in Russian)
27. Cao X., Cai S.F., Fehniger T., Song J., Collins L.I., Pivnicka-Worms D.R., Ley T.J. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 2007; 27(4): 635–46.
28. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 8(7): 523–32.

Поступила 05.10.15

Принята к печати 11.02.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155-006.04-06:616.24-002-022.6]-02

Тихомиров Д.С., [Гаранжа Т.А.], Туполева Т.А., Троицкая В.В., Галстян Г.М., Филатов Ф.П.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЧАСТОТУ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВИРУСНЫХ ПНЕВМОНИЙ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 126167, г. Москва, Россия

Проанализирована частота выявления и концентрация ДНК герпес-вирусов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных заболеваниями системы крови при развитии пневмонии на фоне или после курсов полихимиотерапии основного заболевания. Лаважную жидкость исследовали на наличие ДНК цитомегаловируса, ДНК вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, ДНК вируса Эпштейна–Барр и ДНК вируса герпеса человека 6-го типа. Также оценены факторы, потенциально увеличивающие частоту реактивации эндогенных герпесвирусов: возраст старше 50 лет, наличие клинико-лабораторных признаков иммунодефицита (агранулоцитоз и/или гипогаммаглобулинемия), а также тяжесть состояния, требующая перевода в реанимационное отделение. Показано, что наиболее часто выявляемым вирусом является вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов. Определенные закономерности обнаружены только при анализе частоты выявления и концентрации его ДНК. В подавляющем большинстве положительных образцов концентрация ДНК этого вируса находилась в области высоких значений (до 10^7 копий/мл). Возраст старше 50 лет, а также лабораторные признаки иммунодефицита не оказывали существенного влияния на частоту развития герпес-вирус-ассоциированной пневмонии. Также нет данных, оценивающих тяжесть течения вирус-ассоциированной пневмонии на фоне иммунодефицита.

Ключевые слова: герпес-вирусы; вирус-ассоциированная пневмония; онкогематологические больные.

Для цитирования: Тихомиров Д.С., Гаранжа Т.А., Туполева Т.А., Троицкая В.В., Галстян Г.М., Филатов Ф.П. Факторы, влияющие на частоту возникновения вирусных пневмоний у онкогематологических больных. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(1): 37–42. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-37-42

Tikhomirov D.S., [Garanzha T.A.], Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Galstyan G.M., Filatov F.P.

FACTORS AFFECTING THE INCIDENCE OF VIRAL PNEUMONIA IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

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

The aim of the study was to analyze clinical significance of herpes viruses DNA monitoring in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with hematological malignancies and pneumonia during or after chemotherapy. Samples of 171 enrolled patients were tested for human cytomegalovirus (CMV) DNA, herpes simplex virus I and II types (HSV) DNA, Epstein-Barr virus (EBV) DNA and human herpes virus 6 type (HV6) DNA. Viral load in BALF was also measured. Factors potentially increasing the rate of reactivation of endogenous herpes viruses have been evaluated. Among them: age of 50 years and over, laboratory signs of immunodeficiency like neutropenia and/or hypogammaglobulinemia, severity of condition/need for admission to ICU.

Results. HSV DNA proved the highest detection in BALF frequency. Statistically significant difference for HSV DNA detection rate was obtained (Chi-sq. = 7.65; p = 0.022) for patients with all evaluated factors. HSV 1 and 2 of types were shown to be the most frequently identified viruses. In majority of samples HSV viral load in BALF lies within high values such as 30% and above of ICU patient's BALF samples. In the vast majority of positive samples of DNA the concentration of this virus was in the area of high values (up to 10^7 copies/ml). Age over 50 years, and also such laboratory signs of immunodeficiency as neutropenia and/or hypogammaglobulinemia had no significant effect on the incidence rate of the development of herpes virus-associated pneumonia. There are no data evaluating the severity of virus-associated pneumonia against the background of immunodeficiency. There is no data describing the severity of the course of herpes virus associated pneumonia in patients with hematological malignancies.

Key words: herpes viruses; virus associated pneumonia; hematological malignancies.

For citation: Tikhomirov D.S., Garanzha T.A., Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Galstyan G.M., Filatov F.P. Factors affecting the incidence of viral pneumonia in patients with hematological malignancies. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya).* 2016; 61(1): 37–42. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-1-37-42

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 08 November 2015

Accepted 11 February 2016

Среди факторов, вызывающих реактивацию эндогенных герпес-вирусов, можно выделить следующие: иммунодефицит [1–5], травма мягких тканей, термический шок, избыточная инсоляция или радиоактивное облучение, а также острые бактериальные инфекции [6–8]. Ведущим из них считается иммунодефицит. Снижение иммунитета может наблюдаться на фоне возрастных изменений или вторичных иммунодефицитных состояний, в том числе ВИЧ-инфекции, цитопении, стресса различного генеза [5–11]. Функциональные нарушения иммунитета, предшествующие реактивации герпес-вирусов, могут касаться любых клеток иммунной системы: Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов, макрофагов, НК-клеток, системы комплемента, цитокинов и пр. [1, 2]. Онкогематологические больные являются группой риска развития герпетических инфекций. Последнее десятилетие обсуждают вопрос об этиологической роли герпес-вирусов в поражении органов дыхания у иммунокомпрометированных пациентов [2–18], особенно у пациентов, находящихся в критических состояниях и/или на искусственной вентиляции легких [19–26]. Иммунодефицит у онкогематологических больных обусловлен множеством факторов, среди которых течение основного заболевания и проводимая химиотерапия (ХТ). Развитие инфекционных осложнений часто возникает на фоне цитостатической терапии при развитии нейтропении вплоть до агранулоцитоза [2, 3, 5, 11, 12, 14, 15]. Нозокомиальные пневмонии являются одними из тяжелейших инфекционных осложнений у данной категории больных. Антибактериальная терапия может оказаться неэффективной из-за резистентности микроорганизмов бактериальной или грибковой природы, а также из-за присоединения патогенов вирусной природы, в частности эндогенных герпес-вирусов. Данные литературы [10–15, 18], описывающие вирус-ассоциированные поражения органов дыхания у онкогематологических больных, крайне скудны.

Цель настоящей работы – оценить факторы, влияющие на частоту возникновения и вирусную нагрузку при вирус-ассоциированной пневмонии у онкогематологических пациентов.

Материал и методы

В исследование был включен 171 больной с заболеваниями системы крови, находившиеся на лечении в ФГБУ «Ге-

матологический научный центр» Минздрава России (ГНЦ, Москва), у которых была выявлена пневмония. Характеристика пациентов приведена в **табл. 1**.

Из факторов, возможно оказывающих влияние на возникновение герпес-вирус-ассоциированной пневмонии, оценивали следующие:

- возраст старше 50 лет;
- наличие лабораторных признаков иммунодефицита: агранулоцитоз – снижение концентрации нейтрофилов (гранулоцитов) в периферической крови ниже 500/мкл, а также гуморальный иммунодефицит (снижение сывороточного IgG менее 95 МЕ/мл и IgM – ниже 60 МЕ/мл).
- тяжесть состояния, требующая перевода пациента в реанимационное отделение.

Искусственная вентиляция легких (ИВЛ) не выделена в изучаемые факторы, поскольку существует множество работ, доказывающих ее причастность к вирусной реактивации при поражении легких [21, 22, 25]. У всех больных пневмония и/или острая дыхательная недостаточность (ОДН) были диагностированы на основании осмотра лечащим врачом и подтверждена по результатам компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки. Всем больным проводили фиброbronхоскопию с проведением бронхоальвеолярного лаважа. Развитие пневмонии в подавляющем большинстве случаев наблюдалось после курса ХТ. Все пациенты получали антибактериальную терапию с момента появления первых симптомов пневмонии.

В качестве клинического материала была исследована бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ). Взятие БАЛЖ осуществляли по методике, принятой в ГНЦ (Москва) [14, 15]. Для молекулярно-биологических исследований использовали 10 мл БАЛЖ. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с помощью тест-систем фирмы ООО «ИнтерЛаб-Сервис», предварительно сконцентрировав БАЛЖ в 10 раз (до 1 мл). Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Таблица 1

Характеристика больных	
Параметр	Значение
Пол:	
мужской	96
женский	75
Возраст, годы	
медиана (минимум–максимум),	45 (18–84)
Число больных старше 50 лет	71
Число иммунокомпрометированных больных (агранулоцитоз, гипогаммаглобулинемия)	77
Число больных, госпитализированных в отделение реанимации	40
Заболевания системы крови:	
Острые лейкозы:	
острый миелоидный лейкоз	53
острый лимфобластный лейкоз	22
Хронические лейкозы:	
хронический лимфолейкоз	4
хронический миелолейкоз	1
Волосатоклеточный лейкоз	4
Неходжкинская лимфома	42
Множественная миелома	12
Лимфогранулематоз	11
Миелодиспластический синдром	11
Апластическая анемия	11

Для корреспонденции:

Тихомиров Дмитрий Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и ее компонентов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 126167, г. Москва, Россия. E-mail: tihomirovgnc@bk.ru

For correspondence:

Tikhomirov Dmitry S., BD, PhD, senior researcher of the Laboratory of Viral Safety of Transfusions of Blood and Blood Components of National Research Center for Hematology. Moscow, 126167, Russian Federation. E-mail: tihomirovgnc@bk.ru.

Information about authors:

Tupoleva T.A., <http://orcid.org/0000-0003-4668-9379>, Researcher ID: P-7607-2014; Troitskaya V.V., <http://orcid.org/0000-0002-4827-8947>, Researcher ID: M-8639-2014; Galstyan G.M., <http://orcid.org/0000-0001-8818-8949>.

в режиме реального времени определяли концентрацию вирусспецифических ДНК: вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1,2), вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), используя наборы реагентов той же фирмы. Полученные количественные результаты нормировали на 1 мл неконцентрированной БАЛЖ. Нормирование проводили посредством добавления внутреннего контрольного образца (ВКО), представляющего собой генно-инженерную конструкцию. Также в качестве внутреннего контрольного образца, свидетельствующего об успешном выделении из клинического образца нуклеиновых кислот и их амплификации, использовали человеческую ДНК из ядросодержащих клеток (миоглобиновый ген – ген «домашнего хозяйства» клетки, наличие которого свидетельствует о наличии клеточной ДНК). Концентрация клеточного ВКО указывает на содержание ядросодержащих клеток в клиническом образце. За порог концентрации вирусной ДНК, выше которого нагрузка считается условно высокой, было принято 1000 копий геном-эквивалент на 1 мл БАЛЖ (копий/мл).

Для выяснения серологического статуса образцы крови пациентов исследовали на наличие анamnестических антител – тотальных иммуноглобулинов класса G к ЦМВ, ВПГ-1,2 и ВГЧ-6, а также иммуноглобулинов класса G к ядерному антигену ВЭБ с помощью тест-систем ЗАО «ВекторБест».

Для статистических расчетов критериев Пирсона χ^2 или точного критерия Фишера использовали пакет программ EPI5 версии 5.0. Доверительный интервал статистически значимых различий составлял 5% ($p = 0,05$).

Результаты

Наличие одновременно нескольких факторов, способствующих реактивации эндогенных герпес-вирусов, является особенностью пациентов, включенных в исследование. Результаты серологических исследований показали, что все включенные в исследование пациенты были серопозитивными, т.е. инфицированными изучаемыми вирусами. Таким образом, выявление вирусспецифической ДНК в каждом случае свидетельствовало либо о реактивации эндогенного вируса, либо о реинфекции другим штаммом вируса, но не о первичной герпетической инфекции. Результаты качественных исследований приведены в табл. 2.

Таблица 2

ДНК герпес-вирусов в БАЛЖ онкогематологических больных (общее количество исследованных образцов БАЛЖ 171)

Фактор, провоцирующий реактивацию герпес-вирусов	Число пациентов с тем или иным фактором	ДНК ЦМВ		ДНК ВЭБ		ДНК ВПГ-1,2		ДНК ВГЧ-6	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Возраст старше 50 лет	71	12	16,9	17	23,9	19	26,7	9	12,7
Нейтропения и/или гуморальный иммунодефицит	77	7	9,1	14	18,2	21	27,3	10	13
Госпитализация в реанимационное отделение	40	10	25	7	17,5	20	50	7	17,5
χ^2		5,3		0,99		7,65		0,58	
p		0,07		0,609		0,022		0,749	

Примечание. Здесь и в табл. 3: жирным шрифтом выделены значения χ^2 и p , указывающие на статистически значимые различия.

В образцах БАЛЖ пациентов, которым потребовался перевод в реанимационное отделение, частота выявления герпес-вирусных ДНК оказалась выше, чем у других пациентов. Наименьшая частота выявления герпес-вирусных ДНК в БАЛЖ этих больных отмечена для ВЭБ и ВГЧ-6 (17,5% образцов), а максимальная – для ВПГ-1,2 (50% образцов). В других группах пациентов наименьшая частота отмечена для ДНК ЦМВ (9,1% образцов), а максимальная – для ДНК ВПГ-1,2 (27,3% образцов) у пациентов с нейтропенией. Однако статистическая обработка данных показала статистически значимые различия ($p = 0,05$) только для ВПГ-1,2. Полученные данные свидетельствуют, что развитие критических состояний, требующих перевода пациента в реанимационное отделение, ассоциировано с выявлением в БАЛЖ генома этого вируса. Аналогичная тенденция, но без статистически значимых различий ($p = 0,07$), была обнаружена для ЦМВ. В каждом четвертом образце БАЛЖ включенных в исследование больных, госпитализированных в реанимационное отделение, была выявлена ДНК ЦМВ. Подобное распределение частоты выявления ДНК герпес-вирусов в БАЛЖ от пациентов с заболеваниями системы крови мы выявили и в предыдущих работах [3, 10–13].

Данные количественных исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

Сравнительная оценка вирусной нагрузки в БАЛЖ онкогематологических больных в зависимости от факторов, провоцирующих реактивацию герпес-вирусов

Фактор, провоцирующий реактивацию герпес-вирусов	Число пациентов с тем или иным фактором	ДНК ЦМВ, копий/мл				p	ДНК ВЭБ, копий/мл				p	ДНК ВПГ-1,2, копий/мл				p	ДНК ВГЧ-6, копий/мл				p
		<1000		≥1000			<1000		≥1000			<1000		≥1000			<1000		≥1000		
		абс.	%	абс.	%		абс.	%	абс.	%		абс.	%	абс.	%		абс.	%	абс.	%	
Возраст старше 50 лет	71	8	11,3	4	5,6	0,227	8	11,3	9	12,7	0,610	5	7	14	19,7	0,026	6	8,5	3	4,3	0,301
Нейтропения и/или гуморальный иммунодефицит	77	4	5,2	3	3,9	0,699	7	9,1	7	9,1	1,000	5	6,5	16	20,8	0,006	7	9,1	3	3,9	0,191
Госпитализация в реанимационное отделение	40	7	17,5	3	7,5	0,176	3	7,5	4	10	0,692	2	5	12	30	0,003	5	12,5	2	5	0,235

Образцы с условно низкой (до 1000 копий/мл) и условно высокой (более 1000 копий/мл) концентрацией вирусной ДНК встречались, как правило, с равной частотой. Однако отмечена особенность для герпес-вирусов, относящихся к β -подсемейству: концентрация ДНК ЦМВ и ДНК ВГЧ-6 примерно в 2 раза чаще фиксировали в области низких значений (см. табл. 2).

Только для ВПГ концентрация ДНК статистически значимо чаще находилась в области высоких значений. Самая высокая частота высоко титражных по ДНК ВПГ-1,2-образцов обнаружена у больных, находившихся в отделении реанимации (30% образцов БАЛЖ).

Обсуждение

Развитие агранулоцитоза значительно повышает риск развития инфекционных осложнений [1–3, 5, 7, 11, 15–18]. Полученные данные показали, что агранулоцитоз и/или гипогаммаглобулинемия не оказывают существенного влияния на частоту выявления ДНК ЦМВ, ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ-6 в БАЛЖ у пациентов с заболеваниями системы крови, но влияют на частоту выявления ДНК ВПГ-1,2.

Обнаружение ДНК герпес-вирусов в БАЛЖ позволяет констатировать реактивацию вируса, хотя и не доказывает герпес-вирусную этиологию поражения легких. Несмотря на широкий диагностический арсенал практически невозможно определить, является ли вирусная репликация причиной пневмонии.

Другим важным вопросом при диагностике герпес-вирусных инфекций является дифференциация между первичным инфицированием и реактивацией эндогенного вируса. В наших наблюдениях речь идет о реактивации, поскольку все пациенты при выявлении пневмонии уже были серопозитивными, т.е. имели анамнестические антитела IgG к вирусу, чей геном был обнаружен. Важную роль в реактивации герпес-вирусов играет искусственная вентиляция легких. По данным литературы [21–29], вирусная реактивация происходит на 3–5-й день от начала ИВЛ. После этого начинается экспоненциальный рост вирусной нагрузки. Показано, что максимальная концентрация вируса наблюдается на 12-й день ИВЛ [21]. В этом случае наиболее вероятным источником может служить поражение слизистой оболочки в результате интубации и проникновение вируса из нервных ганглиев. P. Vucunseels и соавт. [26] показали, что реактивация латентного ВПГ имеет прямую связь не столько с наличием вируса в верхних дыхательных путях, сколько с самим фактом интубации и с длительностью ИВЛ, а также с длительностью пребывания в реанимационном отделении.

Другим важным аспектом лабораторной диагностики герпетических инфекций при поражении органов дыхания является количественная оценка вирусного процесса (вирусной нагрузки). Данных литературы, которые бы описывали вирусную нагрузку или концентрацию ДНК герпес-вирусов в БАЛЖ, крайне мало. Существующие работы [20–24, 26, 28, 29], как правило, посвящены исследованию ВПГ у пациентов с поражением легких. Активность

вирусного процесса, очевидно, можно оценить, измерив концентрацию вирусной ДНК в биологическом материале. В этом случае возникает вопрос о цифровом выражении полученного результата. Измерение вирусной нагрузки может быть осуществлено двумя способами: подсчет числа копий вирусной ДНК на объем исследуемой жидкости или на количество ядросодержащих клеток в материале. При проведении настоящего исследования концентрацию вирусной ДНК оценивали как по клеточной ДНК в образцах, так и по искусственно введенному генно-инженерному контрольному образцу. При этом даже у больных, находившихся в состоянии агранулоцитоза, концентрация ядросодержащих клеток обнаруживалась в пределах нескольких млн на 1 мл БАЛЖ. Клеточный состав БАЛЖ, представлен клетками, выстилающими область взятия образца, как правило, альвеолярными макрофагами. При сравнении величин концентраций, рассчитанных двумя методами, мы не отметили преимуществ какого-либо из них. Высокие и низкие концентрации вирусспецифических ДНК в образцах БАЛЖ всегда оставались таковыми независимо от метода расчета. К аналогичному выводу пришли E. Frobert и соавт. [29]. Оценка полученных количественных результатов затруднена, поскольку в настоящее время отсутствуют критерии, определяющие порог вирусной нагрузки, которую можно считать диагностической. Некоторые авторы [27–29] считают таким порогом 10^3 – 10^4 копий/мл. Отталкиваясь от этих значений, мы проанализировали распределение концентраций вирусных ДНК в образцах БАЛЖ. Статистически значимые различия были выявлены только для ВПГ-1,2. ДНК этого вируса в подавляющем большинстве образцов находилась в области высоких значений (10^3 – 10^6 копий/мл). Геномы других вирусов (ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6), напротив, находились в области низких значений (500–1000 копий/мл). При этом частота выявления ДНК герпес-вирусов, принадлежащих β -подсемейству, а именно ЦМВ и ВГЧ-6, в низкой концентрации всегда была в 2 раза выше, чем в области высоких значений (см. табл. 3). Это еще раз подчеркивает похожесть этих вирусов по многим параметрам, начиная с наличия гомологичных вирусных генов (например, *UL96*) и, следовательно, генных продуктов – вирусных белков также идентичной архитектуры вирионов, и заканчивая цитопатогенными свойствами. По данным литературы [1, 9], ВГЧ-6 представлен в виде двух штаммов – ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, который является более распространенным (2,5 и 99% соответственно, в некоторых случаях выявляются сразу оба вида). Главное отличие штаммов состоит в большей нейротропности ВГЧ-6А. Также они отличаются по воздействию на зараженную клетку: ВГЧ-6А может, в отличие от ВГЧ-6В стимулировать выработку *INF α* и *IL-1 β* . Он подавляет экспрессию поверхностного *CD3* [1]. В целом ВГЧ-6А вызывает более серьезные поражения, нежели ВГЧ-6В [1, 9]. При современной рутинной лабораторной диагностике крайне редко проводят дифференциацию между двумя этими вирусами. Известно, что ВГЧ-6 обладает супрессивным действием на костно-мозговое кроветворение [1].

In vitro при заражении интактных мононуклеарных клеток костного мозга, ВГЧ-6 подавляет рост гранулоцит-макрофаг колониобразующих единиц, гранулоцит-эритроцит-макрофаг-мегакариоцит колониобразующих единиц и стромальных клеток на 40–74% [1]. Таким образом, активация этого вируса может повлиять на костно-мозговое кроветворение. Следовательно, своевременная диагностика инфекции, вызванной этим вирусом, является актуальной у реципиентов аллогенного костного мозга.

Гистологическое или гистохимическое исследование легочной ткани позволяет почти однозначно идентифицировать этиологический агент поражения. К сожалению, практически отсутствуют описания морфологических изменений легочной ткани при герпетических поражениях. Биопсия легкого является травмирующей диагностической процедурой. У больных онкогематологического профиля она зачастую невозможна из-за тромбocyтении, сопряженной с геморрагическими осложнениями. Таким образом, бронхоскопия, сопровождающаяся взятием БАЛЖ, остается предпочтительным методом, позволяющим диагностировать этиологический агент для этой категории больных. Одним из доказательств вирусной этиологии поражения является ответ на противовирусную терапию. Даже низкие концентрации вирусных ДНК могут свидетельствовать о вирусной этиологии поражения [10, 12, 13].

В настоящее время нет данных, связывающих прогноз и тяжесть течения пневмонии с выявлением герпес-вирусов в БАЛЖ у онкогематологических больных. Проведенное исследование указывает на возможную диагностическую значимость выявления герпес-вирусных ДНК в БАЛЖ пациентов, находящихся в состоянии агранулоцитоза. Доказательством вирусной этиологии поражения легких и других осложнений может являться ответ на противовирусное лечение. Тем не менее нет однозначного мнения о необходимости назначения противовирусной терапии в подобных случаях. Согласно полученным данным, пониженное количество гранулоцитов не влияло ни на частоту выявления тех или иных герпес-вирусов, ни на вирусную нагрузку в БАЛЖ. Нет данных, оценивающих тяжесть течения вирус-ассоциированной пневмонии при лабораторных признаках иммунодефицита.

Таким образом, при исследовании факторов, которые могут оказывать влияние на частоту возникновения вирус-ассоциированной пневмонии у онкогематологических больных и больных апластической анемией, определенные закономерности были обнаружены только для ВПГ-1,2. Из вирусов герпетической группы он наиболее часто встречается в БАЛЖ этих пациентов, при этом концентрация его ДНК в подавляющем большинстве образцов находится в области высоких значений (до 10^7 копий/мл). У онкогематологических больных, которым потребовался перевод в реанимационное отделение, чаще в БАЛЖ выделяется ДНК ВПГ-1,2 в высокой концентрации. Возраст 50 лет и старше, а также лабораторные признаки иммунодефицита, такие как миелотоксический агранулоцитоз, нейтропения и/или гипогамма-

глобулинемия, не оказывали существенного влияния на частоту развития герпес-вирус-ассоциированной пневмонии. Нет данных, оценивающих тяжесть течения вирус-ассоциированной пневмонии на фоне иммунодефицита.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Волкова М.А., ред. *Клиническая онкогематология*. Руководство для врачей. М.: Медицина; 2001.
- Тихомиров Д.С., Гаранжа Т.А., Троицкая В.В., Суворова П.А., Ярославцева Н.Г., Туполева Т.А. и др. Лабораторная диагностика герпес-вирусных инфекций у больных острыми лейкозами. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(1): 19–21.
- Меликян А.Л., Гаранжа Т.А., Тихомиров Д.С., Капланская И.Б., Варламова Е.Ю., Ковалева Л.Г., Филатов Ф.П. Вирус Эпштейна–Барр у больных с затяжной лимфаденопатией. *Гематология и трансфузиология*. 2007; 4: 21–7.
- Гаранжа Т.А., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Савченко В.Г., Филатов Ф.П. Особенности диагностики инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, у пациентов со сниженным иммунитетом. *Справочник заведующего КДЛ*. 2011; 8: 26–32.
- Гаранжа Т.А., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Ярославцева Н.Г., Филатов Ф.П. Комплексное лабораторное обследование онкогематологических больных с пневмонией. В кн.: *Материалы VII съезда гематологов и трансфузиологов республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии»*. Минск; 2012: 265–8.
- Тихомиров Д.С., Гаранжа Т.А., Троицкая В.В., Галстян Г.М., Паровичникова Е.Н., Филатов Ф.П. Лабораторные маркеры герпес-вирусных инфекций при нозокомиальных пневмониях у онкогематологических больных при лейкопении. *Вестник гематологии*. 2014; 4: 67–8.
- Тихомиров Д.С., Гаранжа Т.А., Туполева Т.А., Троицкая В.В., Паровичникова Е.Н., Галстян Г.М. и др. Лабораторная диагностика герпес-вирусных инфекций при развитии пневмонии на фоне полихимиотерапии у онкогематологических больных. В кн.: *Материалы XIX Всероссийской научно-практической конференции «Консолидация науки и практики в лабораторной медицине»*. Москва, 25–27 марта 2014 г. *Лаборатория*. 2014; 2: 15.
- Гаранжа Т.А., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Троицкая В.В., Паровичникова Е.Н., Галстян Г.М. и др. Герпес-вирус ассоциированные пневмонии у онкогематологических больных. Роль молекулярных методов диагностики. В кн.: *Сборник трудов VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014»*. Москва, 18–20 марта 2014 г. Москва; 2014. т. 1: 302–3.
- Галстян Г.М., Кесельман С.А., Городецкий В.М., Алексанян М.Ж., Куликов С.М., Гемджян Э.Г. и др. Сочетанное проведение химиотерапии гемобластозов и терапии острой дыхательной недостаточности в реанимационных условиях. *Терапевтический архив*. 2009; 12: 37–43.
- Галстян Г.М., Гласко Е.Н., Городецкий В.М., Гржимоловский А.В., Данишян К.И., Демидова И.А. и др. Биопсия легкого в диагностике причин поражения легких у больных гемобластомами. *Терапевтический архив*. 2003; 75(10): 57–64.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Pellet P.E., Roizman B. Herpes viridae. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B., eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2013. vol. 2: 1802–2080.
- Volkova M.A. *Clinical oncohematology*. Guidelines for doctors. Moscow: Meditsina; 2001. (in Russian)
- Tikhomirov D.S., Garanzha T.A., Troitskaya V.V., Suvorova P.A., Yaroslavtseva N.G., Tupoleva T.A., et al. Laboratory diagnostic of herpes virus infections in patients with acute leukemia. *Issues of Virology (Voprosy virusologii)*. 2009; 54(1): 19–21. (in Russian)
- Melikyan A.L., Garanzha T.A., Tikhomirov D.S., Kaplanskaya I.B., Varlamova E.Yu., Kovalyova L.G., Filatov F.P. Epstein–Barr virus in patients with persistent lymphadenopathy. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2007; 4: 21–7. (in Russian)
- Garanzha T.A., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Savchenko V.G., Filatov F.P. Diagnostic features of Epstein–Barr virus in patients with reduced immunity. *Guide head of clinical diagnostic laboratory. Russian Journal (Spravochnik zaveduyushchego KDL)*. 2011; 8: 26–32. (in Russian)

6. Deayton J.R., Sabin C.A., Johnson M.A., Emery V.C., Wilson P., Griffiths P.D. Importance of cytomegalovirus viremia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet*. 2004; 363(9427): 2116–21.
7. Verschuuren E.A.M. Balance between Herpes Viruses and Immunosuppression after Lung Transplantation. Netherlands; 2006. ISBN 90-367-2869-X. <http://www.rug.nl/research/portal/files/2864452/thesis.pdf>
8. Falcone E.L., Adegbulugbe A.A., Sheikh V., Imamichi H., Dewar R.L., Hammoud D.A., et al. Cerebrospinal fluid HIV-1 compartmentalization in a patient with AIDS and acute varicella-zoster virus meningomyelomalacia. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(5): e135–42. doi: 10.1093/cid/cit356.
9. Razonable R.R., Fanning C., Brown R.A., Espy M.J., Rivero A., Wilson J., et al. Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(1): 110–3.
10. Garanzha T.A., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Yaroslavtseva N.G., Filatov F.P. Comprehensive laboratory examination of patients with hematological malignancies with pneumonia. In: Proceedings of the 7th Congress of Hematology and Blood Transfusion of the Republic of Belarus "Actual problems of Hematology and Blood Transfusion", Minsk. 2012: 265–8. (in Russian)
11. Tikhomirov D.S., Garanzha T.A., Troitskaya V.V., Galstyan G.M., Parovichnikova E.N., Filatov F.P. Herpes virus infections in hematological patients with leucopenia during nosocomial pneumonia. *Bulletin of Hematology. Russian journal (Vestnik gematologii)*. 2014; 4: 67–8. (in Russian)
12. Tikhomirov D.S., Garanzha T.A., Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Parovichnikova E.N., Galstyan G.M., et al. Laboratory diagnosis of herpesvirus infections in patients with hematological malignancies with pneumonia during chemotherapy. In: Proceedings of the XIX Annual conference "The Consolidation of science and practice in laboratory medicine". Moscow, 25–27 March 2014. Moscow; 2014; 2: 15. (in Russian)
13. Garanzha T.A., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Parovichnikova E.N., Galstyan G.M., et al. Herpes virus associated pneumonia in patients with hematological malignancies. The role of molecular diagnostic methods. Proceedings of the VIII Annual conference "Molecular diagnostic 2014", Moscow, 18–20 March, 2014. Moscow; 2014; 1: 302–3. (in Russian)
14. Galstyan G.M., Kesel'man S.A., Gorodetskiy V.M., Aleksanyan M.Zh., Kulikov S.M., Gemdzhyan E.G., et al. Acute respiratory failure treatment during hematological malignancy chemotherapy in ICU. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2009; 12: 37–43. (in Russian)
15. Galstyan G.M., Glasko E.N., Gorodetskiy V.M., Grzhimolovskiy A.V., Danishyan K.I., Demidova I.A., et al. Lung biopsy useful for lung injury diagnosis in patients with hematological malignancies. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2003; 75(10): 57–64. (in Russian)
16. Gondo H., Harada M., Minematsu T., Akashi K., Hayashi S., Taniguchi S., et al. Cytomegalovirus antigenemia in the differential diagnosis of pulmonary infiltrates after allogeneic bone marrow transplantation. *Rinsho Ketsueki*. 1993; 34 (11): 1438–44.
17. Konoplev S., Champlin R.E., Giralt S., Ueno N.T., Khouri I., Raad I., et al. Cytomegalovirus pneumonia in adult autologous blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27(8): 877–81.
18. Nguyen Q., Champlin R., Giralt S., Rolston K., Raad I., Jacobson K., et al. Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28(3): 618–23.
19. Schuller D., Spessert C., Fraser V.J., Goodenberger D.M. Herpes simplex virus from respiratory tract secretions: epidemiology, clinical characteristics, and outcome in immunocompromised and nonimmunocompromised hosts. *Am. J. Med.* 1993; 94(1): 29–33.
20. van den Brink J.W., Simoons-Smit A.M., Beishuizen A., Girbes A.R., van Strack Schijndel R.J., Groeneveld A.B. Respiratory herpes simplex virus type 1 infection/colonization in the critically ill: marker or mediator? *J. Clin. Virol.* 2004; 30(1): 68–72.
21. Luyt C.E., Combes A., Deback C., Aubriot-Lorton M.H., Nieszkowska A., Trouillet J.L., et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 175(9): 935–42. doi: 10.1164/rccm.200609-1322oc.
22. Bouza E., Giannella M., Torres M.V., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Hernandez R.I., Muñoz P.; Gregorio Maraón Task Force for Pneumonia. Herpes simplex virus: a marker of severity in bacterial ventilator-associated pneumonia. *J. Crit. Care*. 2011; 26(4): 432. e1–6. doi: 10.1016/j.jcrc.2010.10.008.
23. Assink-de Jong E., Groeneveld A.B., Pettersson A.M., Koek A., Vandenbroucke-Grauls C.M., Beishuizen A., Simoons-Smit A.M. Clinical correlates of herpes simplex virus type 1 loads in the lower respiratory tract of critically ill patients. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 79–83. doi: 10.1016/j.jcv.2013.05.007.
24. Gooskens J., Templeton K.E., Claas E.C., van Bussel M.J., Smit V.T., Kroes A.C. Quantitative detection of herpes simplex virus DNA in the lower respiratory tract. *J. Med. Virol.* 2007; 79(5): 597–604.
25. Lópea-Giraldo A., Sialer S., Esperatti M., Torres A. Viral-reactivated pneumonia during mechanical ventilation: is there need antiviral treatment? *Front. Pharmacol.* 2011; 2: 66. doi: 10.3389/fphar.2011.00066.
26. Bruynseels P., Jorens P.G., Demey H.E., Goossens H., Pattyn S.R., Elseviers M.M., et al. Herpes simplex virus in the respiratory tract of critical care patients: a prospective study. *Lancet*. 2003; 362(9395): 1536–41.
27. Linssen C. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in infectious disorders. 2007 ISBN: 978-90-5278-664-3. [http://www.oud.ildcare.eu/Downloads/proefschriften/Thesis Kitty Linssen.pdf](http://www.oud.ildcare.eu/Downloads/proefschriften/Thesis%20Kitty%20Linssen.pdf). Available on: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.05.007>
28. Lasithiotaki I., Antoniou K.M., Vlahava V.M., Karagiannis K., Spanidou D.A., Siafakas N.M., Sourvinos G. Detection of herpes simplex virus type-1 in patients with fibrotic lung diseases. *PLoS ONE*. 2011; 6(12): e27800. doi:10.1371/journal.pone.0027800.
29. Robert E., Billaud G., Casalegno J.S., Eibach D., Goncalves D., Robert J.M., et al. The clinical interest of HSV 1 semi-quantification in bronchoalveolar lavage. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 265–8. doi: 10.1016/j.jcv.2013.04.019.

Поступила 08.11.15
Принята к печати 11.02.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.194.125-053.2-07:616.152.72

Сметанина Н.С.^{1,2}, Терещенко Г.В.¹, Красильникова М.В.¹, Гвоздев А.А.¹, Ибрагимова Д.И.¹,
Митрофанова А.М.¹, Лохматова М.Е.¹, Новичкова Г.А.¹

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ НАКОПЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА У ДЕТЕЙ С ТРАНСФУЗИОННОЗАВИСИМОЙ В-ТАЛАССЕМИЕЙ

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии, иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия; ²ФГБУ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Накопление избытка железа в органах и тканях существенно повышают заболеваемость и смертность у больных трансфузионнозависимыми формами анемии. Благодаря современным методам МРТ в режиме T2* стало возможно неинвазивно оценить накопление железа в различных органах. Цель настоящей работы – оценить степень перегрузки железом печени, миокарда, поджелудочной железы и гипофиза у детей различного возраста с трансфузионнозависимой большой формой β-талассемии и провести анализ адекватности проводимой хелаторной и трансфузионной терапии. В исследование был включен 21 пациент (12 мальчиков, 9 девочек) в возрасте 3–15 лет (медиана возраста 8 лет) с большой формой β-талассемии. До момента исследования хелаторную терапию не получали 6 детей в возрасте 3–11 лет (медиана возраста 6,5 лет). Всем детям проведено исследование содержания ферритина и растворимого трансферринового рецептора (рТФР) в сыворотке крови, МРТ в режиме T2* гипофиза, миокарда, печени и поджелудочной железы на томографе мощностью 1,5Т. Для оценки степени фиброза и гемосидероза печени проводили чрескожную пункционную биопсию печени с последующим гисто-

логическим и гистохимическим исследованием биоптата. Обнаружена взаимосвязь между содержанием железа в миокарде и активностью эритропоэза ($r = 0,230$). Выявлена высокая обратная корреляция между концентрацией железа в печени и накоплением железа в поджелудочной железе ($r = -0,585$), обратная корреляция между накоплением железа в гипофизе и поджелудочной железе ($r = -0,430$). Большая часть обследованных детей ($n = 12$) имела перегрузку железом как поджелудочной железой, так и гипофиза, что соответствовало сокращению времени МР-сигнала T2*, 8 больных – перегрузку железом гипофиза при допустимом содержании железа в поджелудочной железе, и только 1 ребенок не имел отложений железа в гипофизе и поджелудочной железе. Таким образом, гипофиз накапливает избыток железа существенно раньше, чем поджелудочная железа, но до наступления пубертата эти изменения гипофиза не имеют клинических проявлений. Накопление избытка железа в организме сопровождается в первую очередь повреждением гипофиза с последующим вовлечением поджелудочной железы и далее миокарда. Результаты регрессионного анализа свидетельствуют о нелинейной зависимости между концентрацией ферритина сыворотки и накоплением железа в гипофизе, что не позволяет использовать концентрацию ферритина сыворотки как маркер накопления железа в гипофизе. Проведение комплексной оценки накопления железа в органах как перед первым назначением хелаторной терапии, так и в динамике, позволит своевременно провести коррекцию дозового режима и сохранить нормальную функцию не только печени и миокарда, но и эндокринных органов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: перегрузка железом; МРТ-диагностика; дети; талассемия.

Для цитирования: Сметанина Н.С., Терещенко Г.В., Красильникова М.В., Гвоздев А.А., Ибрагимова Д.И., Митрофанова А.М., Лохматова М.Е., Новичкова Г.А. Оценка степени накопления железа у детей с трансфузионнозависимой β -талассемией. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 42–48. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-42-48

Smetanina N.S.^{1,2}, Tereshchenko G.V.¹, Krasilnikova M.V.¹, Gvozdev A.A.¹, Ibragimova D.I.¹, Mitrofanova A.M.¹, Lokhmatova M.E.¹, Novichkova G.A.¹

ASSESSMENT OF IRON ACCUMULATION IN CHILDREN WITH TRANSFUSION DEPENDENT β -THALASSEMIA

¹Federal Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. D.Rogachev, Moscow, 117997, Russian Federation; ²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation

Accumulation of excess iron in the organs and tissues significantly increases morbidity and mortality rates in patients with transfusion-dependent forms of anemia. The purpose of the study were to assess the degree of iron overload of the liver, myocardium, pancreas and pituitary gland in children of various ages with transfusion-dependent major form of β -thalassemia and to analyze the adequacy of ongoing chelation and transfusion therapy. 21 patient with β -thalassemia were included in the study. Prior to the study 6 children did not receive chelation therapy. In all children the serum concentrations of ferritin and soluble transferrin receptor (rTFR) were examined and T2* mode MRI investigations of pituitary, myocardium, liver and pancreas were performed. For the assessment of the degree of liver fibrosis and hemosiderosis there was performed liver biopsy. There was correlation between the iron content in the myocardium and erythropoiesis activity ($r = 0.230$). There was revealed the high inverse correlation between the concentration of iron in the liver and the accumulation of iron in the pancreas ($r = -0.585$), an inverse correlation between the accumulation of iron in the pituitary gland and pancreas ($r = -0.430$). The most of the children ($n = 12$) had iron overload as of the pancreas, as well of the pituitary, which corresponds to a T2*MR signal time shortening, 8 patients had iron overload of the pituitary in allowable iron content in the pancreas, and only the one child had iron deposition neither in the pituitary nor in pancreas. Thus, the pituitary gland accumulates excess iron significantly earlier than the pancreas, but before the onset of puberty, the pituitary gland, these changes of the pituitary do not have clinical manifestations. Accumulation of excess iron in the body is accompanied by a damage of the pituitary gland with following involvement of the pancreatic gland and myocardium. The regression analysis revealed a non-linear relationship between the concentration of serum ferritin and iron accumulation in the pituitary gland. These results don't allow to consider the serum ferritin concentrations as a marker of the accumulation of iron in the pituitary gland.

К е y w o r d s: iron overload; MRI diagnosis; children; thalassemia.

For citation: Smetanina N.S., Tereshchenko G.V., Krasilnikova M.V., Gvozdev A.A., Ibragimova D.I., Mitrofanova A.M., Lokhmatova M.E., Novichkova G.A. Assessment of iron accumulation in children with transfusion dependent β -thalassemia. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(1): 42–48. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-42-48

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 11 December 2015

Accepted 11 February 2016

Перегрузка железом – одна из основных проблем у больных наследственными и приобретенными формами анемий, в лечении которых применяют регулярные трансфузии эритроцитной массы. В физиологических условиях поступление железа в организм и его «выделение» сбалансировано около 1 мг/сут. Больные большой формой β -талассемии

или другой рефрактерной формой анемии, которые ежемесячно получают 2–4 дозы эритроцитной массы, ежегодно получают 5000–10 000 мг железа или 0,3–0,6 мг/кг в сутки [1]. Организм человека, как и любой другой, не имеет механизма выделения избытка железа. Более того, неэффективный эритропоэз, сопровождающий промежуточную и большую

Для корреспонденции:

Сметанина Наталья Сергеевна, доктор мед. наук, профессор, заместитель директора Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии, иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия. E-mail: nataliya.smetanina@fnkc.ru.

For correspondence:

Smetanina Nataliya S., MD, PhD, DSc, Deputy Director of the Federal Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Professor of Department of Oncology, Hematology and Radiation Therapy of Pediatric Faculty of Pirogov Russian National Research Medical University. Moscow, 117997, Russian Federation. E-mail: nataliya.smetanina@fnkc.ru.

Таблица 1

Характеристика пациентов

Пациент №	Пол	Возраст, годы	ФС, мкг/л	рТФР, мг/л	Хелаторная терапия
1	Ж	5	541	12,8	DFX 20 мг/кг в сутки с 4 лет, нерегулярно (только в периоды госпитализации)
2	М	3	950	11,9	DFX 20 мг/кг в сутки с 2,5 года, регулярно
3	М	6	3990,1	11,9	DFO 35 мг/кг в сутки с 3,5 года в течение 1 года, далее не проводили в течение 1,5 года
4	Ж	8	4574,2	15,2	DFO 40 мг/кг в сутки с 5 лет в течение 1 года, далее не проводили в течение 2 лет
5	М	3	1117	15,1	Ранее не получал
6	Ж	11	572,5	15,5	Ранее не получала
7	М	9	428	17,7	Ранее не получал
8	М	7	1608	10,6	DFX 20 мг/кг в сутки с 4 лет, регулярно
9	Ж	4	1202	12	Ранее не получала
10	М	11	1865	13	DFO 40 мг/кг в сутки с 7 лет 3–4 раза в неделю, DFX 20 мг/кг в сутки с 9 лет, нерегулярно (только в периоды госпитализаций)
11	Ж	9	4797,1	н.д.	DFO 40 мг/кг в сутки с 5 лет, затем DFX 20 мг/кг в сутки с 6 лет, регулярно
12	Ж	8	1723,2	8,12	DFX 20 мг/кг в сутки с 6,5 года, регулярно
13	Ж	7	1438,1	14,7	DFX 20 мг/кг в сутки с 7,5 года, регулярно
14	М	5	703,6	8,41	DFX 30 мг/кг в сутки с 2,5 года, 20 мг/кг в сутки с 4 лет, регулярно
15	М	15	1354,3	17,2	DFO 40 мг/кг в сутки подкожно 5 дней в неделю с 7 лет; DFO 40 мг/кг в сутки подкожно через день в сочетании с DFP 60 мг/кг в сутки ежедневно с 12 лет, регулярно
16	М	4	1991	7,46	Ранее не получал
17	М	6	1906	9,02	DFX 20 мг/кг в сутки с 3 лет, регулярно
18	М	8	4788	8,9	DFX 20 мг/кг в сутки с 5,5 года, в 6 лет – токсический гепатит, далее DFO 40 мг/кг в сутки нерегулярно (в период госпитализаций внутривенно 7-дневные курсы)
19	М	13	1912	6,1	DFX 20 мг/кг в сутки с 3,5 года, нерегулярно
20	Ж	9	1294	8,5	DFO 40 мг/кг в сутки с 4 лет; с 6 лет добавлен DFP (60 мг/кг в сутки)
21	Ж	9	1713,9	н.д.	Ранее не получала

Примечание. н.д. – нет данных; DFX – деферазирокс; DFO – деферроксамин; DFP – деферипрон.

формы β-талассемии и некоторые другие анемии, приводит к усилению всасывания железа за счет продукции фактора роста и дифференцировки 15 (growth and differentiation factor 15 – GDF15) и, возможно, других белков (например, TWSGI) эритробластами, ингибирующих гепсидин [2].

Формирующаяся перегрузка железом, лечение которой не проводится, приводит к повреждению жизненно важных органов. Считается, что перегрузка железом печени и миокарда развивается крайне редко в детском возрасте, несмотря на то, что уже к 10 годам больные дети получили большое количество донорской эритроцитной массы [3].

Для оценки запасов железа в организме человека в настоящее время используют несколько методов. Определение содержания ферритина сыворотки (ФС) используют повсеместно для мониторинга запасов железа и для принятия решения о начале

хелаторной терапии. Существует прямая зависимость содержания ФС и продолжительности жизни больных большой формой β-талассемии [4, 5]. Однако его концентрация в организме больного зависит от наличия воспаления, дефицита аскорбата и от функции печени, что существенно ограничивает диагностическое значение. Измерение содержания железа в печени (liver iron concentration – LIC) – прямой метод оценки запасов железа в организме человека [6], однако недостаточный размер биоптата (менее 1 мг сухого веса, менее 4 мг влажного веса или менее 2,5 см длины) или неравномерное распределение паренхимы печени, особенно при наличии фиброза/цирроза, может привести к неадекватному (заниженному) результату исследования [7]. Инвазивность метода определяет его ограниченное применение, особенно в педиатрии. Благодаря современным методам магнитно-резонансной томографии (МРТ) в режиме T2* стало возможно неинвазивно оценить накопление железа в различных органах, прежде всего в печени [8, 9] и миокарде [3, 10, 11], а также в поджелудочной железе [12], в том числе у пациентов детского возраста. Время МР-сигнала T2* – время необходимое органу отразить примерно $2/3$ сигнала, измеряют в миллисекундах (мс), его обратная величина – R2* (1000/T2*) измеряют в с⁻¹. Время МР-сигнала T2* уменьшается по мере повышения содержания железа. Опубликовано несколько результатов сравнительного анализа T2* печени (исследования проводили на томографах мощностью 1,5Т) с результатами LIC, полученными прямым определением железа в биоптате [8, 13, 14]. Недавно опубликованные исследования [11] по валидации этого метода показали четкую корреляционную взаимосвязь T2* миокарда с химическим определением железа

в миокарде в аутопсийном материале. В последнее время появились сообщения об измерении накопления железа в гипофизе методом МРТ в режиме T2* у здоровых добровольцев и больных трансфузионнозависимой большой формой β-талассемии старше 18 лет [15, 16].

В соответствии с современными стандартами терапии трансфузионнозависимой большой формы β-талассемии больные должны получать регулярные заместительные трансфузии эритроцитной массы для поддержания гемоглобина в диапазоне 95–125 г/л (нормотрансфузионный режим) и регулярную хелаторную терапию, цель которой – снижение токсичного пула железа внутри клеток и во внеклеточном пространстве, снижение общих запасов железа в организме, что позволяет предотвратить необратимое повреждение органов и тканей [17]. Перед началом или модификацией хелаторной терапии необходимо

Таблица 2

Накопление железа в органах в зависимости от концентрации ФС; медиана (мин–макс)

Показатель	Ферритин сыворотки, мкг/л				Референтные значения
	ниже 1000 (n = 5)	1000–1500 (n = 5)	1500–2000 (n = 7)	выше 2500 (n = 4)	
ЛІС, мг/г с.м.	4,3 (1,3–8,3)*	8,72 (2,9–18,2)*	10,69 (2,2–14,3)*	16,45 (13–19,5)	< 1,8
T2* миокарда, мс	46,74 (26,9–61,7)	46,28 (34,5–58,6)	44,47 (21,9–81)	34,93 (29,8–43,6)	> 20
МІС, мг/г с.м.	0,462 (0,29–0,81)	0,446 (0,31–0,6)	0,53 (0,21–1,1)	0,61 (0,45–0,72)	≤ 0,9
T2* поджелудочной железы, мс	35,92 (33,3–37,4)*	27,18 (3,6–74,7)*	26,19 (2,1–56,9)*	16,53 (3,8–52,2)	> 33,3
T2* гипофиза, мс	47,04 (31,3–64,9)	33,8 (7,9–52,8)	43,34 (14,1–89)	28,83 (11,3–44,9)	> 88,9
Гистологический индекс активности по Кноделю	1 (0–2)	2 (2–4)	3 (3–4)	5 (5–6)	0
Гистологический индекс фиброза печени по Метавир	0 (0–2)	1 (1–3)	1 (1–2)	1 (1–2)	0
Гистологическая степень гемосидероза печени	1 (1–2)	2 (1–4)	3 (2–4)	4	0

Примечание. * $p < 0,05$.

оценить степень перегрузки железом как печени, так и миокарда [17, 18]. Хелаторную терапию в случае трансфузионной перегрузки железом необходимо начать при достижении содержания ФС более 1000 мкг/л (в анамнезе 10–20 трансфузий эритроцитной массы), в случае перегрузки железом у трансфузионнонезависимых больных – при ФС более 600 мкг/л. При снижении концентрации ФС на фоне хелаторной терапии деферазироксом до 500 мкг/л (дефероксамином или деферипроном – до 1000 мкг/л) необходимо прервать хелаторную терапию [17, 18].

Цель настоящей работы – оценить степень перегрузки железом печени, миокарда, поджелудочной железы и гипофиза у детей различного возраста с трансфузионнозависимой большой формой β -талассемии и провести анализ адекватности проводимой хелаторной и трансфузионной терапии.

Материал и методы

После одобрения Локальным этическим комитетом ФНКЦ ДГОИ в исследование был включен 21 пациент (12 мальчиков, 9 девочек) в возрасте 3–15 лет (медиана возраста 8 лет) с трансфузионнозависимой большой формой β -талассемии. Регулярные заместительные трансфузии эритроцитной массы 19 больным были начаты с 3 мес жизни и продолжают по настоящее время с интервалом в 3–4 нед при концентрации гемоглобина до трансфузии 75–80 г/л. Двое пациентов (№ 6 и 7) не получали заместительную терапию эритроцитной массой, содержание гемоглобина (Hb) у них сохранялось в диапазоне 45–60 г/л, что сопровождалось резким увеличением размеров и печени, и селезенки, существенным отставанием в физическом развитии и выраженной специфической деформацией плоских костей, особенно лицевого скелета. Данные о хелаторной терапии, проводимой пациентам, включенным в исследование, представлены в **табл. 1**. До момента исследования хелаторную терапию не получали 6 детей в возрасте 3–11 лет (медиана возраста 6,5 лет). Своевременное начало хелаторной терапии было отмечено только у 2 больных (пациенты № 2 и 14). В остальных случаях хелаторная терапия деферазироксом была инициирована при ФС значительно выше 1000 мкг/л в возрасте старше 3 лет в дозе 20 мг/кг в сутки, в большинстве случаев хелаторная терапия была нерегулярной или в недостаточной дозе. У 6 пациентов после проведенного исследования была инициирована хелаторная терапия деферазироксом в дозе 30 мг/кг в сутки для достижения отрицательного баланса железа в организме при сохраняющихся регулярных заместительных трансфузиях эритроцитной массы.

Всем детям проведено исследование содержания ФС и растворимых трансферриновых рецепторов (рТФР) в сыворотке

крови, МРТ в режиме T2* гипофиза, миокарда, печени и поджелудочной железы на томографе GE Signa 1.5T («Дженерал Электрик», США) мощностью 1,5T, в ряде случаев под общей анестезией. ЛІС и концентрацию железа в миокарде (Myocardial Iron Concentration – МІС) рассчитывали с помощью специальной программы [19, 20]. Значения ЛІС 0,1–2,0 мг/г сухой массы (далее по тексту с.м.) расценивали как норму, 2–7 мг/г с.м. – легкая перегрузка железом печени, 7–15 мг/г с.м. – умеренная перегрузка железом печени и более 15 мг/г с.м. – тяжелая перегрузка железом печени [21]. Значения T2* для сердца не менее 20 мсек и МІС не более 1,16 мг/г с.м. принимали за норму, 10–20 мсек и 1,16–2,71 мг/г с.м. расценивали как умеренную перегрузку железом, менее 10 мс, более 2,71 мг/г с.м.) – тяжелая перегрузка железом [10, 11]. Содержание железа в поджелудочной железе и гипофизе оценивали по времени МР-сигнала T2*. Значения T2* для поджелудочной железы более 33,3 мс принимали за нормальные значения, 10–33,3 мс – легкую перегрузку железом, 2,5–10 мс – умеренную перегрузку железом, более 2,5 мс – тяжелую перегрузку железом [16]. Значения T2* для гипофиза более 88,9 мс принимали за нормальные, при снижении T2* менее 88,9 мс – перегрузку железом [15]. Объем гипофиза рассчитывали стандартным методом.

Для оценки степени фиброза и гемосидероза печени проводили чрескожную пункционную биопсию печени с последующим гистологическим и гистохимическим исследованием биоптата. Гистологически определенный гемосидероз печени 0–1-й степени соответствует ЛІС 0,1–2,0 мг/г с.м., 2-й степени – 2–7 мг/г с.м., 3-й степени – 7–15 мг/г с.м., 4-й степени – более 15 мг/г с.м. [22].

Для детального анализа накопления железа в органах мы разделили обследованных пациентов на несколько групп в зависимости от концентрации ФС: менее 1000 мкг/л, 1000–1500 мкг/л, 1500–2000 мкг/л и более 2500 мкг/л (**табл. 2**). Пациентов с содержанием ФС в диапазоне 2000–2500 мкг/л в нашей выборке не было.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel 2010 («Корпорация Майкрософт», США). Различия между значениями, оцененные по параметрическому критерию Стьюдента, считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ корреляций между переменными проводили по методу Спирмена (r).

Результаты

Результаты комплексного обследования детей представлены в **табл. 1** и **2**.

При анализе группы пациентов, ранее не получавших хелаторную терапию, обращают на себя внимание значительные различия в накоплении железа в органах. У 2 детей (пациенты № 6 и 7) отмечено незначительное повышение концентрации ФС

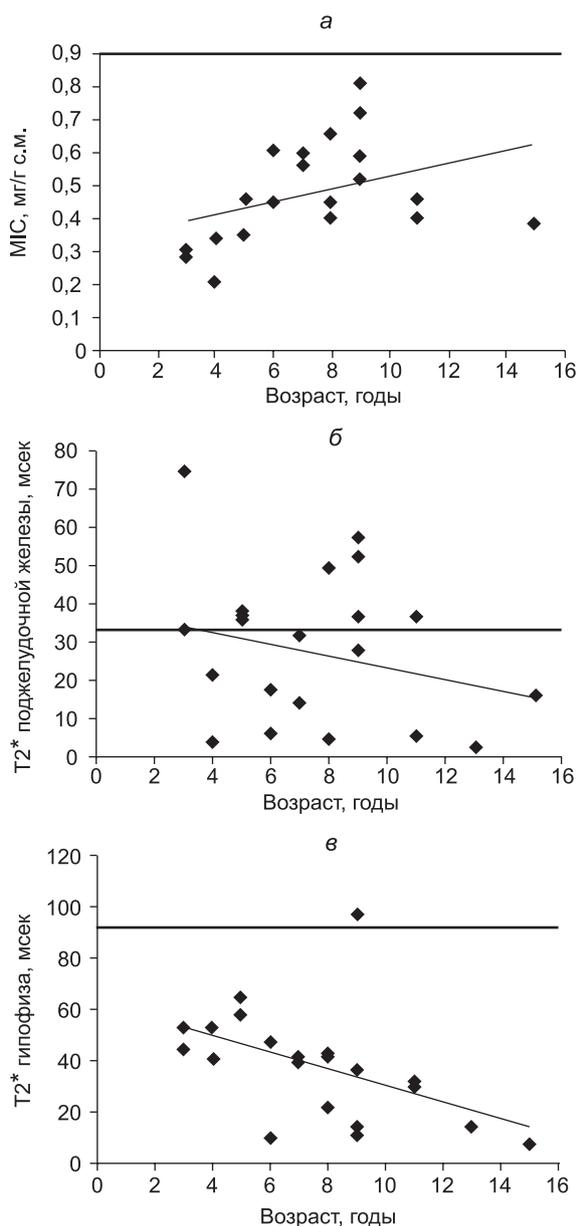


Рис. 1. Накопление железа в миокарде, поджелудочной железе и гипофизе в зависимости от возраста больного.

a – концентрация железа в миокарде (MIC) ($r = 0,382$), толстая линия на отметке 1,9 мг/г с.м. обозначает верхнюю границу нормы; *б* – накопление железа в поджелудочной железе по изменению времени МР-сигнала ($T2^*$) ($r = -0,244$), толстая линия на отметке 33,3 мсек обозначает нижнюю границу нормы; *в* – накопление железа в гипофизе по изменению времени МР-сигнала ($T2^*$) ($r = -0,529$), толстая линия обозначает нижнюю границу нормы.

(572,5 мкг/л и 428 мкг/л соответственно), при этом значительное накопление железа по данным МРТ в режиме $T2^*$ было обнаружено только в гипофизе при умеренной перегрузке железом печени (гистологически 2-я степень гемосидероза печени у обоих детей, LIC 7,77 и 7,37 мг/г с.м. соответственно) и допустимых количествах железа в миокарде и поджелудочной железе, что свидетельствует о высокой уязвимости гипофиза к токсическому воздействию избытка железа в организме в условиях отсутствия какого-либо лечения большой формы талассемии. У 3 больных (пациенты № 9, 16 и 21) была диагностирована тяжелая перегрузка железом печени

(гистологически 4-я степень гемосидероза печени, LIC 15,48–16,69 мг/г с.м.), значительное накопление железа в поджелудочной железе у 2 из них (пациенты № 9 и 16) и значительное накопление железа в гипофизе. Только у 1 больного (пациент № 5, ФС 1117 мкг/л) было отмечено незначительное накопление железа в паренхиме печени (гистологически 2-я степень гемосидероза печени, LIC 4,83 мг/г с.м.) без изменения количества железа в других обследованных органах.

Анализируя содержание железа в миокарде у всех обследованных детей (рис. 1, *a*) оказалось, что с возрастом у пациентов отмечается медленное накопление железа в миокарде ($r = 0,372$), однако не достигает критического количества, развитием угрожающих жизни аритмий и нарушением сократительной функции миокарда. Аналогичную тенденцию мы наблюдали и для накопления железа в поджелудочной железе ($r = -0,244$) и в гипофизе ($r = -0,478$) (рис. 1, *б*, *в*). В нашем исследовании мы обнаружили взаимосвязь между содержанием железа в миокарде и активностью эритропоэза у обследованных пациентов ($r = 0,230$) (рис. 2). Высокая активность собственного неэффективного эритропоэза приводит к более интенсивному накоплению железа, в том числе и в миокарде.

У 5 больных в возрасте 3–11 лет (медиана возраста 5 лет) содержание ФС было менее 1000 мкг/л (пациенты №1, 2, 6, 7, 14). Трое из них ранее не получали хелаторную терапию (пациенты №1, 6, 7, последние два ребенка также не получали и трансфузионную терапию). В этой группе детей мы диагностировали незначительное накопление железа в печени (гистологически 2-я степень гемосидероза печени, LIC 5,45–7,77 мг/г с.м.). В других исследованных органах отложения железа не обнаружено, что свидетельствовало в пользу сохранности функции внутренних органов, и было подтверждено соответствующими показателями биохимического анализа крови и функционального исследования органов.

Группа из 5 детей в возрасте 4–15 лет (медиана возраста 7 лет), имевших ФС в диапазоне 1000–1500 мкг/л (медиана 1294 мкг/л), неоднородна по накоплению железа во внутренних органах, из них у 2 (пациенты № 9 и 13) LIC была крайне высокой 18,2 и 15,4 мг/г с.м. При этом оказалось, что накопление в паренхиме поджелудочной железы, по данным $T2^*$, у пациента № 9 было большим (3,6 мс, что соответствует умеренной перегрузке железом этого органа и крайне высокому риску нарушения толерантности к глюкозе) [8]. У остальных 3 больных LIC была в диапазоне 2,9–3,9 мг/г с.м., что незначительно превышает нормальное содержание железа в печени (гистологически 2-я степень гемосидероза печени). Однако у пациента №15 оказалось катастрофически много железа в гипофизе ($T2^*$ гипофиза 7,9 мс). Принимая во внимание высокую степень гистологической активности в печени (индекс Кноделя 7), можно предположить, что перегрузка железом у пациента № 15 существовала длительно, и только в последние годы хелаторная терапия стала адекватной, именно это и привело к поражению гипофиза.

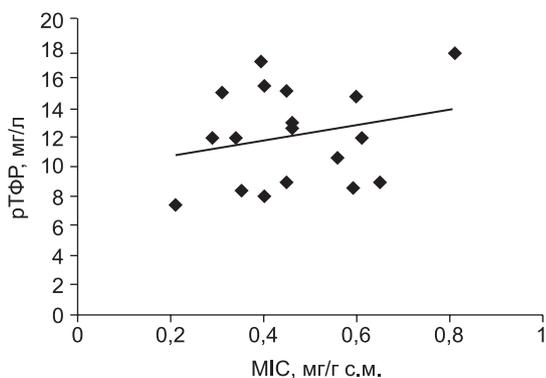


Рис. 2. Взаимосвязь содержания железа в миокарде (MIC) и активности эритропоэза у больных с трансфузионнозависимой большой формой талассемии (pTFR) ($r = 0,230$).

У 7 детей в возрасте 3–13 лет (медиана возраста 8 лет) с ФС 1500–2000 мкг/л было отмечено большее накопление железа в паренхиме печени (медиана LIC 10,69 мг/г с.м., гистологически 3-я степень гемосидероза печени у подавляющего большинства больных). У пациента №16, ранее не получавшего хелаторную терапию, была отмечена высокая перегрузка железом только в ткани печени (LIC 13,1 мг/г с.м., гистологически 4-я степень гемосидероза печени), накопления железа в других органах не выявлено. У самого старшего пациента этой группы (пациент №19, возраст 13 лет) вместе с накоплением железа в печени (LIC 12,8 мг/г с.м., гистологически 4-я степень гемосидероза печени, индекс Кноделя 4) обнаружена перегрузка железом поджелудочной железы ($T2^*$ поджелудочной железы 2,1 мс) и выраженное накопление железа в гипофизе ($T2^*$ гипофиза 14,1 мс). Пациент №10 при высокой LIC 13,1 мг/г с.м. накопил большое количество железа в поджелудочной железе ($T2^*$ 4,8 мс), в то время как содержание железа в ткани сердца и гипофиза оставалось в допустимых количествах ($T2^*$ миокарда и гипофиза 42,8 мс и 30 мс соответственно; MIC 0,46 мг/г с.м.).

У 4 пациентов в возрасте 6–9 лет (медиана возраста 8 лет) с ФС более 2500 мкг/л (3990,1–4797,1 мкг/л, медиана 4681 мкг/л) перегрузка железом печени была самая высокая (гистологически 4-я степень гемосидероза печени, LIC 13–19,5 мг/г с.м., медиана 16,45 мг/г с.м.). У всех детей этой группы отмечено существенное относительно снижение времени MR-сигнала гипофиза референтных значений ($T2^*$ гипофиза 11,3–44,9 мсек, медиана 29,55 мс; $p < 0,0001$), из них у 2 больных (пациенты №18 и 3) имела также выраженная перегрузка железом поджелудочной железы ($T2^*$ поджелудочной железы 3,8–4,4 мс), что сопровождалось у этих детей нарушением толерантности к глюкозе.

Обсуждение

Анализ проводимой детям терапии показал, что в 19 случаях трансфузии эритроцитной массы проводили при снижении гемоглобина ниже 80 г/л, т.е. нормотрансфузионный режим не соблюдался, а 2 детям вообще не проводили никакую терапию (заболевание протекало «естественным» путем, инвалидизируя больных). Известно, что нормотрансфузионный режим (до трансфузии гемоглобин более 95 г/л; после

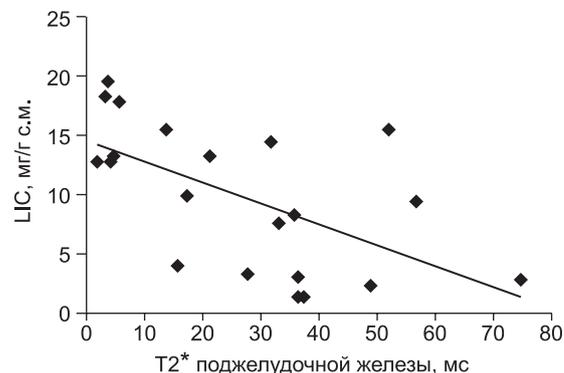


Рис. 3. Взаимосвязь содержания железа в печени (LIC) с накоплением железа в поджелудочной железе ($r = -0,585$).

трансфузии гемоглобин 115–125 г/л) обеспечивает эффективное подавление неэффективного эритропоэза [17]. При отсутствии дефицита железа содержание в сыворотке крови pTFR отражает активность эритропоэза [23]. У подавляющего большинства – у 19 (90%) из 21 больных содержание pTFR было существенно повышено (верхняя граница референтных значений 2,5 мг/л) ($p < 0,0001$), что связано с сохранением высокой активности собственного неэффективного эритропоэза, что в свою очередь сопровождалось увеличением размеров селезенки, в результате несвоевременных заместительных трансфузий эритроцитной массы. У 2 детей, ни разу не получивших трансфузии эритроцитной массы (пациенты №6 и №7), зарегистрирована самая высокая активность эритропоэза (pTFR 15,5 и 17,7 мг/л соответственно) и выраженная спленомегалия

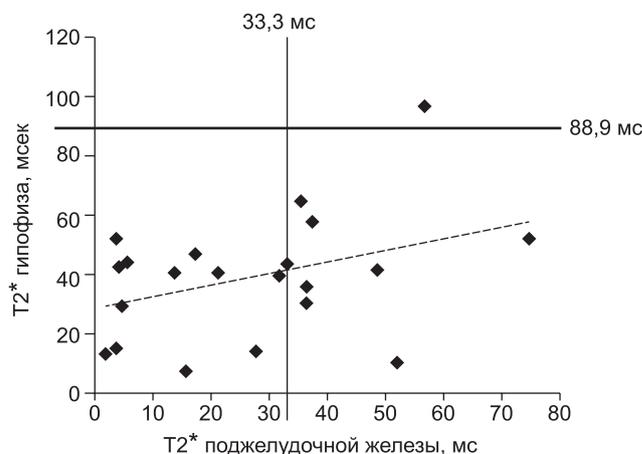


Рис. 4. Взаимосвязь накопления железа в поджелудочной железе и гипофизе ($r = 0,480$), жирные линии показывают нижние границы нормы: вертикальная – $T2^*$ поджелудочной железы 33,3 мс; горизонтальная – $T2^*$ гипофиза 88,9 мс; ромбы – значения для каждого исследованного пациента. Нижний левый квадрант содержит индивидуальные значения пациентов, имеющих перегрузку железом как гипофиза, так и поджелудочной железы ($n = 12$), противоположный ему верхний правый квадрант – нормальные значения содержания железа в поджелудочной железе и гипофизе ($n = 1$). Остальные 8 больных имели накопление железа различной степени в гипофизе при допустимом содержании железа в поджелудочной железе.

(селезенка занимала всю левую половину брюшной полости и большую часть малого таза). Адекватная хелаторная терапия позволяет сдерживать накопление железа в организме больного и, при необходимости, достичь негативный баланс железа, сохраняя органы и ткани пациента от повреждающего действия избытка железа [17, 18]. Однако 6 больным хелаторную терапию не проводили совсем (см. табл. 1), а у 13 (62%) больных терапия была неадекватной (недостаточная доза, нерегулярный прием препарата и/или несвоевременно начата), что способствовало накоплению железа в органах и тканях.

Мы выявили высокую обратную корреляцию между LIC и накоплением железа в поджелудочной железе ($r = -0,585$; рис. 3), обратную корреляцию между накоплением железа в поджелудочной железе и гипофизе ($r = -0,430$; рис. 4), что согласуется с ранее опубликованными данными [24] по исследованию накопления железа у трансфузионнозависимых больных большой формой β -талассемии старше 18 лет. При этом было обнаружено, что большая часть обследованных детей ($n = 12$) имела перегрузку железом как поджелудочной железы, так и гипофиза, что соответствовало сокращению времени МР-сигнала T2* (на рис. 4, нижний левый квадрант), 8 больных – перегрузку железом гипофиза при допустимом содержании железа в поджелудочной железе, и только один ребенок не имел отложений железа как в гипофизе, так и в поджелудочной железе. Подобное распределение больных свидетельствует о том, что гипофиз накапливает избыток железа существенно раньше, чем поджелудочная железа, но до наступления пубертатного периода эти изменения гипофиза не имеют клинических проявлений. Результаты регрессионного анализа свидетельствуют о нелинейной зависимости между концентрацией ФС и накоплением железа в гипофизе, что не позволяет использовать концентрацию ФС как маркер накопления железа в гипофизе. Полученные нами данные демонстрируют значительное накопление железа в поджелудочной железе и/или гипофизе до наступления выраженной перегрузки железом миокарда, что требует проведения тщательного мониторинга эффективности и своевременной коррекции дозового режима хелаторной терапии для сохранения нормальной функции эндокринных органов.

Таким образом, адекватная паллиативная терапия (нормотрансфузионный режим и своевременная регулярная в достаточной дозе хелаторная терапия) позволяет предотвратить избыточное накопление железа в органах и тканях, предохраняя их от необратимого повреждения железом. Накопление избытка железа в организме сопровождается в первую очередь повреждением гипофиза с последующим вовлечением поджелудочной железы и далее миокарда.

Проведение комплексной оценки накопления железа в органах как перед первым назначением хелаторной терапии, так и в динамике, позволит своевременно провести коррекцию дозового режима, что в свою очередь дает возможность сохранить нормальную функцию не только печени и миокарда, но и эндокринных органов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

18. Сметанина Н.С. Современные возможности хелаторной терапии. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2014; 1: 51–61.
Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Porter J.B. Concepts and goals in the management of transfusional iron overload. *Am. J. Hematol.* 2007; 82(12, Suppl): 1136–9.
- Tanno T., Bhanu N.V., Oneal P.A., Lee Y.T., Moroney J.W., Reed C.H., et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.* 2007; 13(9): 1096–101.
- Wood J.C., Tyszk J.M., Caeson S., Nelson M.D., Coates T.D. Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease. *Blood*. 2004; 103(5): 1934–6.
- Olivieri N.F., Nathan D.G., MacMillan J.H., Wayne A.S., Liu P.P., McGee A., Martin M., et al. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331(9): 574–8.
- Gabutti V., Piga A. Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematol.* 1996; 95(1): 26–36.
- Angelucci E., Brittenham G.M., McLaren C.E., Ripalti M., Baronciani D., Giardini C., et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343(5): 327–31.
- Villeneuve J.P., Bilodeau M., Lepage R., Côté J., Lefebvre M. Variability in hepatic iron concentration measurement from needle-biopsy specimens. *J. Hepatol.* 1996; 25(2): 172–7.
- Wood J.C., Enriques C., Ghugre N., Tyzka J.M., Carson S., Nelson M.D., et al. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*. 2005; 106(4): 1460–5.
- St Pierre T.G., Clark P.R., Chua-anusorn W., Fleming A.J., Jeffrey G.P., Olynyk J.K., et al. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentration using proton magnetic resonance. *Blood*. 2005; 105(2): 855–61.
- Anderson L.J., Holden S., Davis B., Presscott E., Charrier C.C., Bunce N.H., et al. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur. Heart J.* 2001; 22(23): 2171–9.
- Carpenter J.P., He T., Kirk P., Roughton M., Anderson L.J., de Noronha S.V., et al. On T2* magnetic resonance and cardiac iron. *Circulation*. 2011; 123(14): 1519–28. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.007641.
- Noetzi L.J., Mittelman S.D., Watanabe R.M., Coates T.D., Wood J.C. Pancreatic iron and glucose dysregulation in thalassemia major. *Am. J. Hematol.* 2012; 87(2): 155–60.
- Hankins J.S., McCarville M.B., Loeffler R.B., Smeltzer M.P., Onciu M., Hoffer F.A., et al. R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood*. 2009; 113(20): 4853–5.
- Kirk P., He T., Anderson L.J., Roughton M., Tanner M.A., Lam W.W., et al. International reproducibility of single breathhold T2* MR for cardiac and liver iron assessment among five thalassemia centers. *J. Magn. Reson. Imaging*. 2010; 32(2): 315–9.
- Noetzi L.J., Panigrahy A., Hyderi A., Dongelanyan A., Coates T.D., Wood J.C. Pituitary iron and volume imaging in healthy controls. *Am. J. Neuroradiol.* 2012; 33(2): 259–65.
- Wood J.C. Impact of iron assessment by MRI. *Hematology 2011 American society of hematology Education book*, 2011: 443–50.
- Cappellini M.D., Cohen A., Porter J., Taher A., Viprakasit V., eds. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (TDT), 3rd edition. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation; 2014. ISBN-13: 978-9963-717-06-4 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269382/>
- Smetanina N.S. Current possibilities of chelation therapy. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology [Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii]*. 2014; 1: 51–61.
- Juliano J.L., Siqueira M.H.A., Nobrega de Oliveira K.T., Avila L.F., Gottlieb I., Lopes M.U., et al. Use of an accelerated protocol for rapid analysis of iron overload in the heart and liver: the All Iron Detected (AID) multicenter study. *J. Cardiovascular Magnetic Resonance (JCMR)*, 2015; 17 (Suppl. 1): O62. <http://www.jcmr-online.com/content/pdf/1532-429X-17-S1-O62.pdf>
- www.ironcalculator.com
- Telfer P.T., Prestcott E., Holden S., Walker M., Hoffbrand A.V., Wonke B. Hepatic iron concentration combined with long-term monitoring of serum ferritin to predict complications of iron overload in thalassaemia major. *Br. J. Haematol.* 2000; 110(4): 971–7.
- Walker R.J., Miller J.P., Dymock I.W., Shilkin K.B., Williams R. Relationship of hepatic iron concentration to histochemical grading and to total chelatable body iron in conditions associated with iron overload. *Gut*. 1971; 12(12): 1011–4.
- Tancabelic J., Sheth S., Paik M., Piomelli S. Serum transferrin receptor as a marker of erythropoiesis suppression in patients on chronic transfusion. *Am. J. Hematol.* 1999; 60(2): 121–5.
- Christoforidis A., Haritandi A., Perifanis V., Tsatra I., Athanassiou-Metaxa M., Dimitriadis A.S. MRI for the determination of pituitary iron overload in children and young adults with β -thalassaemia major. *Eur. J. Radiol.* 2007; 62(1): 138–42.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.2-055.5/7-085

Андреева Т.А., Лавриченко И.А., Климова Н.И., Залепухина О.Э., Константинова В.Н., Ким А.В.

ОСОБЕННОСТИ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЛЕБРАНДА: ОПЫТ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО ГОРОДСКОГО ЦЕНТРА ПО ЛЕЧЕНИЮ ГЕМОФИЛИИ

Городской центр по лечению гемофилии Санкт-Петербургского ГБУЗ «Городская поликлиника №37», 191186, г. Санкт-Петербург, Россия

Болезнь Виллебранда (БВ) – наследственное заболевание, передающееся аутосомно-доминантным или аутосомно-рецессивным путем, обусловленное различными количественными и качественными дефектами синтеза фактора Виллебранда (ФВ) и характеризующееся симптомами повышенной кровоточивости. В России 2013 г. был объявлен годом болезни Виллебранда. С целью разработки рекомендаций по совершенствованию специализированной медицинской помощи детям и взрослым с БВ в России в рамках данного мероприятия было проведено ретроспективное исследование со сбором информации о больных, состоящих на учете у гематологов регионов с диагнозом БВ (код по МКБ-10 D 68.0). Было обследовано 86 пациентов с подозрением на БВ из регионов Российской Федерации. Диагноз был установлен или подтвержден у 52 (61,6%) пациентов. Представленные данные подтвердили, что современное состояние лабораторной службы в регионах РФ не позволяет выявлять нарушения в системе гемостаза для установления окончательного диагноза. Применение концентратов фактора свертывания VIII + ФВ представляет для России достаточно новый, пока редко применяемый терапевтический подход для остановки кровотечений у пациентов с БВ. Вместе с тем, по результатам данного исследования, он оказался эффективным во всех случаях его применения.

Ключевые слова: болезнь Виллебранда; фактор Виллебранда; десмопрессин; антиген фактора Виллебранда; ристоцетин-кофакторная активность.

Для цитирования: Андреева Т.А., Лавриченко И.А., Климова Н.И., Залепухина О.Э., Константинова В.Н., Ким А.В. Особенности ведения пациентов с болезнью Виллебранда: опыт Санкт-Петербургского городского центра по лечению гемофилии. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 49-53. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-49-53

Andreeva T.A., Lavrichenko I.A., Klimova N.I., Zalepukhina O.E., Konstantinova V.N., Kim A.V.

MANAGEMENT OF PATIENTS WITH VON WILLEBRAND DISEASE: PRACTICE OF ST.PETERSBURG CITY HEMOPHILIA CARE CENTRE

City Hemophilia Care Centre, 191186, St Petersburg, Russian Federation

Von Willebrand disease (vWD) is a heritable disease, which can be inherited by either autosomal dominant or autosomal recessive, caused by qualitative or quantitative deficiency of von Willebrand factor (vWF) and characterized by excessive bleeding. In Russia 2013 was announced as a year of von Willebrand disease. For elaboration of guidelines on improvement of specific care of children and adults suffering from vWD we carried out a retrospective study. Information regarding the patients registered by regional haematologists with diagnosis of vWD (ICD-10 code D 68.0) was collected. There were examined 86 patients suspected for vWD. The diagnosis was confirmed in 52 (61.6%) patients. This data supported opinion that present status of laboratory service in the Russian regions is not satisfactory for detection of coagulation disorders and final diagnosis justification. Factor VIII concentrate is relatively novel but rare for Russian practice therapeutic approach for bleeding treatment in the patients with vWD. According to the results of the study it was effective in all the cases.

Key words: von Willebrand disease, von Willebrand factor, desmopressin, von Willebrand factor antigen, ristocetin cofactor activity.

For citation: Andreeva T.A., Lavrichenko I.A., Klimova N.I., Zalepukhina O.E., Konstantinova V.N., Kim A.V. Management of patients with von Willebrand disease: practice of St Petersburg City Hemophilia Care Centre. *Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. Russian journal. 2016; 61(1): 49-53. DOI:10.18821/0234-5730-2016-61-1-49-53

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding: Biological samples delivery to St Petersburg was supported by the pharmaceutical company “GlaxoSmithKline” (United Kingdom). All the other study activities had no sponsorship.

Received 24 November 2015

Accepted 11 February 2016

Болезнь Виллебранда (БВ) – наследственное заболевание, передающееся аутосомно-доминантным или аутосомно-рецессивным путем, обусловленное различными количественными и качественными дефектами синтеза фактора Виллебранда (ФВ)

Для корреспонденции:

Андреева Татьяна Андреевна, кандидат медицинских наук, заведующая Городским Центром по лечению гемофилии Санкт-Петербургского ГБУЗ «Городская поликлиника №37», 191186, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: spbhc@msn.com.

For correspondence:

Andreeva Tatiana A., MD, PhD, head of City Hemophilia Care Centre, City Outpatient Medical Clinic No37, 191186, St. Petersburg, Russia. E-mail: spbhc@msn.com.

Information about authors:

Andreeva T.A., <http://orcid.org/0000-0002-5649-325X>; Zalepukhina O.E., <http://orcid.org/0000-0001-8813-1272>; Kim A.V. <http://orcid.org/0000-0002-3422-5043>.

и характеризующееся симптомами повышенной кровоточивости.

Известно, что БВ – наиболее широко распространенное заболевание среди геморрагических диатезов. Большинство исследований в различных популяциях определяют распространенность заболевания как 1–2%, т.е. 100 человек на 1 млн населения [1–4].

Аутосомный тип наследования предполагает одинаковую частоту генной трансмиссии у больных обоего пола, но физиологические состояния женского организма, такие как менструация, беременность, роды способствуют более частому проявлению симптомов повышенной кровоточивости среди женщин. По данным различных исследований, женщины составляют примерно 60% больных БВ [5, 6].

Таблица 1
Характеристика обследованных пациентов (n = 86)

Показатель	Число пациентов	
	абс.	%
Взрослые	63	73,3
Дети	23	26,7
Мужчины	32	37,3
Женщины	54	62,7
Очное обращение	71	82,5
Заочная консультация	15	17,5
Скрининг	62	72
Верификация	24	28

За более чем 85 лет, прошедшие с момента первого описания БВ, патофизиология данного заболевания достаточно хорошо изучена [7]. Известно, что болезнь обусловлена различными количественными и качественными дефектами синтеза ФВ, который выполняет в системе гемостаза две основные функции: инициирует адгезию тромбоцитов к поврежденной стенке сосуда и стабилизирует циркулирующий фактор свертывания крови VIII (ФVIII) за счет образования с ним комплекса.

В зависимости от характера нарушений активности ФВ выделяют три основных типа заболевания:

1-й тип – частичный количественный дефицит ФВ;

2-й тип – качественные изменения структуры и функции ФВ (существует около 20 подтипов, важнейшие из них 2А, 2В, 2М, 2N);

3-й тип – полное отсутствие ФВ.

Каждому из этих типов соответствуют определенные патофизиологические механизмы, которые в значительной степени коррелируют с клиническими особенностями и терапевтическими требованиями [8].

Клинические проявления БВ весьма разнообразны и могут меняться у пациента на протяжении жизни. Наиболее характерны при этой патологии носовые кровотечения, меноррагии, кровотечения из слизистых оболочек полости рта, легкое образование синяков, кровотечения после удаления зубов, послеоперационные кровотечения. Желудочно-кишечные кровотечения встречаются относительно редко и могут быть связаны с ангиодисплазией. Было также показано, что в слаборазвитых странах более половины пациентов имеют гемартрозы и гематомы, подобно большому гемофилией [6]. Проявления кровоточивости обычно варьируют от легких до средней степени тяжести, но иногда могут быть опасными для жизни, особенно у больных с 3-м типом и у некоторых пациентов со 2-м типом БВ.

Диагностика БВ базируется на изучении семейного анамнеза, клинических проявлений, результатов лабораторных исследований и молекулярно-генетических аспектов.

При обследовании пациентов необходимо учитывать, что негенетические факторы, такие как физическая нагрузка, стресс, инфекции, уровень гормонов (тиреоидные гормоны, эстрогены) повышают содержание ФВ. При пограничных показателях ФВ необходимо повторять исследования для выявления

легких форм заболевания. Концентрация в плазме ФVIII и ФВ у людей с O(I) группой крови значительно ниже, чем у людей с группами А и В [9, 10]. Этот факт необходимо учитывать при постановке диагноза больным с пограничными показателями ФVIII и ФВ.

В течение последних четырех десятилетий отмечено несколько этапов в лечении БВ, от применения криопреципитата и свежезамороженной плазмы до плазматических концентратов ФVIII высокой степени очистки, плазматических концентратов ФVIII + ФВ или чистого ФВ, а также разработок рекомбинантного ФВ. В настоящее время для лечения БВ существуют два наиболее распространенных класса медикаментозных средств:

- десмопрессин;
- заместительная терапия препаратами-концентратами ФVIII + ФВ.

Вместе с тем текущий регистрационный статус десмопрессина в Российской Федерации (РФ) не позволяет широко его использовать для лечения БВ: препарат не имеет такого официального показания и производится в дозах, намного ниже требуемой для лечения такого контингента. Накопленный и проанализированный практический опыт ведения пациентов мог бы сыграть положительную роль, однако до сих пор в РФ отсутствует единый полный регистр больных с БВ, что препятствует систематизации и обобщению данных по ведению больных и, как следствие, вызывает определенные разногласия среди врачей-специалистов по оптимизации и стандартизации подходов к терапии этой нозологии.

Цель настоящего исследования – оценка состояния специализированной медицинской помощи детям и взрослым с БВ в части регионов РФ.

Материал и методы

Исследование имело ретроспективный характер и проводилось путем анкетирования главных специалистов регионов. Одновременно оценивали возможность лабораторной диагностики БВ в разных регионах РФ со сбором информации о больных, состоящих на учете у гематологов регионов с диагнозом БВ (код по МКБ-10 D 68.0) [11].

Обследование пациентов осуществляли по двум схемам:

- очное обследование пациентов в Санкт-Петербургском Городском центре по лечению гемофилии (ГЦЛГ);
- заочные консультации: проводили забор и транспортировку образцов замороженной плазмы из лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) различных регионов РФ в ГЦЛГ с целью выявления лабораторных нарушений, установления/подтверждения диагноза и выработки рекомендаций по дальнейшему лечению больного. В этом случае биообразцы доставляли из субъектов РФ в Санкт-Петербург при поддержке компании «ГлаксоСмитКляйн» (Великобритания). В остальном обследование пациентов было независимым, все пациенты прошли обследование по системе обязательного медицинского страхования при наличии у них направления базовых ЛПУ.

Результаты

За период с 2012 по 2015 г. в ГЦЛГ было обследовано 86 пациентов из 28 субъектов РФ, 7 федеральных округов, при этом были исключены пациенты из г. Санкт-Петербурга.

В табл. 1 представлено распределение пациентов по возрасту, полу, схеме и типу обследования (очное или заочное, скрининг или верификация диагноза).

Несмотря на удаленность некоторых регионов, наиболее предпочтительной явилась очная форма обследования, ее выбрали 82,5% пациентов. Во всех возрастных группах преобладали лица женского пола – 54 (62,7%). Это подтверждает установленный ранее факт, что на протяжении всей жизни у женщин больше причин для манифестации геморрагического синдрома (репродуктивные факторы), чем у мужчин [5]. Наиболее востребованной медицинской услугой во всех группах явилось первичное установление диагноза, т.е. скрининг (72% пациентов). Наибольшее число обследованных пациентов было из Северо-Западного федерального округа (СЗФО) – 53 (61,6%) пациента – по сравнению с остальными шестью федеральными округами – 33 (38,4%). Данный опыт подтвердил, что оказание медицинской помощи только лишь силами местных ЛПУ, не имеющих современной диагностической базы и возможностей диагностировать БВ, не всегда дает необходимый результат. Однако наличие на территории этого округа или другого, но доступного для пациентов центра гемофилии, располагающего достаточной диагностической базой и отработанной маршрутизацией пациентов (например, ГЦЛГ), позволяет своевременно оказывать специализированную медицинскую помощь этой категории больных.

В частности, среди пациентов СЗФО диагноз БВ был подтвержден у 29 (54,7%) пациентов, у 1 пациента диагноз направления гемофилия А был изменен на диагноз БВ, у 24 (45,3%) пациентов диагноз не подтвержден, более того, у данной категории пациентов не было выявлено никаких нарушений в плазменно-тромбоцитарном звене гемостаза на момент обследования.

Из других регионов РФ диагноз БВ был подтвержден у 23 (69,7%) из 33 пациентов, у 6 (18,1%) пациентов диагноз не подтвержден, у 4 (12,2%) пациентов были изменены диагнозы, из них у 2 пациентов диагностирована тромбоцитопатия, у 2 – тромбастения Гланцмана, у 1 – наследственный дефицит фактора свертывания IX. Кроме того, у 4 больных с установленным диагнозом БВ был определен другой тип заболевания: у 3 больных 1-й тип был изменен на 3-й, у 1 больной – 3-й тип на 1-й тип.

Вышеперечисленные данные подтверждают предположение, что существующее состояние лабораторной службы в регионах не позволяет выявлять нарушения в системе гемостаза для установления правильного диагноза.

В табл. 2 приведено распределение обследованных пациентов с подтвержденным диагнозом БВ по типу заболевания.

Результаты свидетельствуют о преобладании пациентов с БВ 1-го типа – 35 (67,3%) больных, что соответствует данным литературы [1, 2, 6, 12]. Высокая доля пациентов с БВ 3-го типа (28,8%) можно объяснить тем, что на обследование в ГЦЛГ направляли пациентов с наиболее тяжелой клинической картиной заболевания и со значительными нарушениями в системе гемостаза, которые возможно было выявить в неспециализированных ЛПУ. У 2 пациентов диагностирована БВ тип 2N (Нормандия). Данный диагноз

Таблица 2

Распределение пациентов по типу болезни Виллебранда

Тип БВ	Число пациентов	
	абс.	%
Тип 1	35	67,3
Тип 2N	2	3,8
Тип 3	15	28,8
Всего...	52	100

был установлен на основании анамнеза и типа наследования (в семье наблюдались геморрагические проявления у лиц обоих полов), результатов лабораторного обследования (прокоагулянтная активность фактора свертывания VIII значительно снижена, от 2 до 40%), выявлении нормальных или незначимо сниженных значений антигена ФВ (vWF:Ag), ристоцетин кофакторной активности (vWF:RCo) и ристоцетин индуцированной активации тромбоцитов (РИПА).

Учитывая тот факт, что при БВ имеется двойной дефект в системе гемостаза [13–15], целью лечения БВ являлась коррекция данных нарушений: с одной стороны, нормализация связывания ФВ в плазме крови с тромбоцитами, субэндотелием (VWF:Rco, VWF:CB), с другой – повышение сниженного содержания ФVIII в крови. Как было указано выше, в связи с тем, что у доступного в нашей стране десмопрессина отсутствуют официальные показания и лекарственные формы в надлежащих дозировках, препаратом выбора явились концентраты ФVIII + ФВ. В РФ зарегистрировано большое количество концентратов ФVIII с различным содержанием ФВ, однако их состав как раз по ФВ часто является нестандартизованным. Поэтому такие препараты не могут обеспечивать надлежащую эффективность и безопасность, особенно при самостоятельном применении в домашних условиях.

Препаратами выбора с известной стандартизированной активностью ФВ являются: Гемате П («Си Эс Эл Беринг», Германия) и Вилате («Октафарма», Швейцария). До 2015 г. препараты Гемате П и Вилате не входили в список федеральной программы высокотратных нозологий («7 нозологий»), их закупали в ограниченном количестве из средств региональных бюджетов. Поэтому до настоящего времени для купирования и профилактики кровотечений использовали препарат Иммунал («Бакстер АГ», Австрия), в показаниях к применению которого также указана БВ с дефицитом ФVIII.

С 2012 г. под нашим наблюдением находились 16 больных, из них 10 пациентов детского возраста и 6 взрослых, получавших препарат Гемате П (табл. 3). Причиной назначения препарата служила низкая эффективность ранее применяемых концентратов ФVIII. В основном пациенты были из СЗФО и 1 больной из Южного ФО. Препарат Гемате П им закупали из средств регионального бюджета. Гемате П применяли у пациентов с БВ 1-го типа тяжелой формы и 3-го типа. Введение препарата осуществляли больные самостоятельно на дому или в амбулаторных и стационарных условиях. В стационаре

Таблица 3

Распределение пациентов
по демографическим признакам и диагнозу

Показатель	Значение
Пол:	
мужской	4
женский	12
Возраст, годы:	
дети ($n = 10$)	3–12
взрослые ($n = 6$)	21–46
Масса тела, кг:	
дети ($n = 10$)	16–45
взрослые ($n = 6$)	50–62
Основной диагноз:	
БВ, 1-й тип, тяжелая форма	4
БВ, 2-й тип	–
БВ, 3-й тип	12
Сопутствующий диагноз:	
гепатит С	2
гепатит В	–

препарат применяли с целью остановки острых кровотечений, при проведении оперативных вмешательств (у 2 больных), во время беременности и родовспоможения (у 5 больных). Наиболее часто пациенты применяли препарат в режиме по требованию при кровотечениях (7 больных). Также Гемате П был применен у 3 больных детского возраста с высоким риском кровотечений в режиме профилактики из расчета 30–50 МЕ/кг массы тела от 1 до 3 раз в неделю. Профилактическое лечение во время беременности, а также с целью профилактики кровотечения в родах и послеродовом периоде проводили у 1 больной с 3-м типом БВ и у 4 – с 1-м типом БВ, тяжелой формы. При проведении домашнего лечения эффективность препарата изучали на основании самооценки больного: «эффективно» – кровотечение остановилось, «частично эффективно» – кровотечение уменьшилось, но продолжается, «неэффективно» – кровотечение не уменьшилось. При амбулаторном и стационарном лечении осуществляли лабораторный контроль заместительной терапии – определение индекса активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), активности ФVIII и ристоцетин кофакторной активности до инъекции, через 20 мин и перед следующей инъекцией. Эффективность профилактического лечения оценивали по количеству возникающих спонтанных кровотечений в месяц. Следует подчеркнуть, что при всех видах лечения терапия была эффективной и безопасной. При лечении на дому оценка пациентов во всех случаях остановки кровотечения была – «эффективно», кровотечения купировались, в основном, одной инъекцией. При проведении профилактического лечения значительно снизилось количество спонтанных кровотечений или они практически не наблюдались. Уменьшилось количество пропусков посещения детских учреждений у детей, улучшилось качество жизни.

Обсуждение

В РФ 2013 год был объявлен «Годом болезни Виллебранда». Однако результаты проведенной работы свидетельствуют, что современное состояние лабораторной службы в ЛПУ регионов РФ не позволяет с достаточной степенью надежности выявлять нарушения в системе гемостаза для установления окончательного диагноза нарушения свертывания крови, в том числе и БВ. На основании полученных данных могут быть также сделаны заключения:

– клинико-диагностические лаборатории региональных ЛПУ, в основном, выполняют необходимый набор скрининговых тестов, позволяющих заподозрить наличие у больного наследственной коагулопатии;

– в 30–50% регионов существуют коагулологические лаборатории, которые выполняют только обязательные тесты для установления диагноза БВ;

– диагностика подтипов БВ возможна только в нескольких регионах;

– определение структуры мультимеров vWF не проводится даже в научно-исследовательских центрах.

Поскольку ведущие гемофильные центры РФ выполняют основную работу по обследованию и ведению больных из регионов, в методологическом плане проведенная работа показала, что при заочном обследовании пациентов (образцы крови пациентов для исследования в ГЦЛГ собирали на местах) был выявлен ряд недостатков:

– несоблюдение правил заморозки и транспортировки образцов плазмы;

– несоблюдение правил приготовления аликвот плазмы, необходимой для дальнейшего исследования;

– недостаточное количество образцов плазмы на одного пациента (количество аликвот должно быть не менее 3).

Эти моменты следует обязательно учитывать при планировании отправки образцов плазмы пациентов в зависимости от места забора в гематологическую лабораторию.

Применение концентратов ФVIII + ФВ представляет для России достаточно «новый», пока еще не везде применяемый, но перспективный терапевтический подход для остановки кровотечений у пациентов с БВ. В частности, препарат Гемате П оказался эффективным во всех случаях применения, включая те, когда препараты ФVIII с низким содержанием ФВ были малоэффективны.

Эффективность Гемате П оказалась высокой и при использовании его для профилактики кровотечений при оперативных вмешательствах. При проведении самих оперативных вмешательств необходим постоянный лабораторный контроль показателей гемостаза. Большие оперативные вмешательства возможно проводить при активности ФВ не менее 100%, при этом необходимо тщательное соблюдение хирургического (механического) гемостаза. В ранний послеоперационный период необходимо поддерживать активность ФVIII и ФВ не ниже 50–70%, затем проводить постепенное снижение дозы препаратов начиная с 4–6-х суток после операции или травмы.

Практически абсолютная безопасность Гемате П позволила использовать его и в программах домашнего лечения, в режимах профилактики и по требованию. При проведении домашнего лечения эффективность препарата составила 100% во всех случаях. Проведение профилактического лечения является важным аспектом при лечении пациентов с БВ.

Помимо сугубо практических аспектов проведенный опрос выявил и ряд нерешенных терапевтических проблем. Вплоть до настоящего времени не отработаны дозировки и режимы профилактического лечения у пациентов с БВ (возможно, следует ориентироваться на дозы у больных гемофилией). Не определены показания к проведению первичной и вторичной профилактики. Нет убедительных данных о длительном воздействии заместительной терапии ФVIII + ФВ на пациентов с БВ.

Важной проблемой при БВ является ведение пациенток во время беременности, родов и в послеродовом периоде, вопрос преемственности между врачами разных специальностей, в частности между акушерами и гематологами.

Известно, что у пациенток с БВ не нарушаются зачатие и вынашивание [5]. Однако течение беременности у них имеет ряд особенностей: у большинства пациенток с 1-м типом БВ активность ФВ и ФVIII поднимается и достигает нормальных величин со II триместра до родов и снижается в послеродовом периоде, однако у пациенток с БВ 3-го типа нормализации данных показателей не происходит. Спонтанные маточные кровотечения у беременных с БВ могут встречаться с частотой до 33%, преимущественно в I триместре [5]. Кровотечения в раннем послеродовом периоде встречаются с частотой от 23 до 59% [17]. Отсроченные кровотечения могут возникать в сроки до 5 нед после родов у 20–29% [5, 18, 19].

Профилактику кровотечений необходимо проводить при активности ФВ и ФVIII менее 50%. Начинать ее рекомендуется за 2–3 дня до предполагаемых родов и проводить до 5 нед в послеродовом периоде; следует также стараться не применять препараты ФVIII с низким нестандартизованным содержанием ФВ. Родильницам с БВ в связи с опасностью кровотечения требуется более продолжительное наблюдение в стационаре после родов или операции кесарева сечения – 2–3 нед. Очень важным аспектом остается лабораторный контроль на всех этапах ведения беременных.

Выводы

- несмотря на то что БВ распространенное геморрагическое заболевание, выявление пациентов с БВ в регионах РФ остается значительно ниже расчетного;
- лабораторная диагностика и интерпретация полученных результатов нередко затруднена в регионах РФ, для чего необходимо дальнейшее совершенствование лабораторной службы на местах;
- лечение пациентов с БВ представляет определенные трудности, необходимо дальнейшее изучение показаний и методик для проведения профилактического лечения, тактики введения беременных и трансфузионного пособия при оперативных вмеша-

тельствах, а также проведение мониторинга применения концентратов ФVIII + ФВ в хирургии и акушерской практике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Доставка биологических образцов пациентов в Санкт-Петербург осуществлялась при поддержке компании «ГлаксоСмитКляйн» (Великобритания).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Weiss H.J., Ball A.P., Mannucci P.M. Incidence of severe von Willebrand's disease. *N. Engl. J. Med.* 1982; 307(2): 127. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6979706>
2. Mannucci P.M., Bloom A.L., Larrieu M.J., Nilsson I.M., West R.R. Atherosclerosis and von Willebrand factor. I. Prevalence of severe von Willebrand's disease in western Europe and Israel. *Br. J. Haematol.* 1984; 57(1): 163–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6609712>
3. Berliner S.A., Seligsohn U., Zivelin A., Zwang E., Sofferman G. A relatively high frequency of severe (type III) von Willebrand's disease in Israel. *Br. J. Haematol.* 1986; 62(3): 535–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3082350>
4. Holmberg L., Nilsson I.M. Von Willebrand's disease. *Eur. J. Haematol.* 1992; 48(3): 127–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1559569>
5. Kadir R.A., Lee C.A., Sabin C.A., Pollard D., Economides D.L. Pregnancy in women with von Willebrand's disease or factor XI deficiency. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1998; 105(3): 314–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9532993>
6. Sadler J.E., Mannucci P.M., Berntorp E., Bochkov N., Boulyjenkov V., Ginsburg D., et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 2000; 84(2): 160–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959685>
7. Von Willebrand E.A. Hereditary pseudothrombophilia. *Haemophilia.* 1999; 5(3): 223–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444294>
8. Sadler J.E., Gralnick H.R. Commentary: a new classification for von Willebrand disease. *Blood.* 1994; 84(3): 676–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8043857>
9. Souto J.C., Almsay L., Muñiz-Diaz E., Soria J.M., Borrell M., Bayén L., et al. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20(8): 2024–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938027>
10. O'Donnell J., Laffan M.A. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus. Med.* 2001; 11(4): 343–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532189>
11. World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. Occupational Health. 1992. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3376487> <http://www.worldcat.org/isbn/9241544198> <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>
12. Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S. Variant von Willebrand's disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J. Clin. Invest.* 1980; 65(6): 1318–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6773982>
13. Vischer U.M., Wagner D.D. von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 1994; 83(12): 3536–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8204880>
14. Savage B., Saldívar E., Ruggeri Z.M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996; 84(2): 289–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565074>
15. Kuwano A., Morimoto Y., Nagai T., Fukushima Y., Ohashi H., Hasegawa T., et al. Precise chromosomal locations of the genes for dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA), von Willebrand factor (F8vWF) and parathyroid hormone-like hormone (PTHrP) in human chromosome 12p by deletion mapping. *Hum. Genet.* 1996; 97(1): 95–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557270>
16. Kujovich J.L. von Willebrand's disease and menorrhagia: prevalence, diagnosis, and management. *Am. J. Hematol.* 2005; 79(3): 220–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15981234>
17. Kirtava A., Drews C., Lally C., Dilley A., Evatt B. Medical, reproductive and psychosocial experiences of women diagnosed with von Willebrand's disease receiving care in haemophilia treatment centres: a case-control study. *Haemophilia.* 2003; 9(3): 292–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694520>
18. Conti M., Mari D., Conti E., Muggiasca M.L., Mannucci P.M. Pregnancy in women with different types of von Willebrand disease. *Obstet. Gynecol.* 1986; 68(2): 282–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3090493>
19. Greer I.A., Lowe G.D., Walker J.J., Forbes C.D. Haemorrhagic problems in obstetrics and gynaecology in patients with congenital coagulopathies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1991; 98(9): 909–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1911610>

Поступила 24.11.15
Принята к печати 11.02.16

ОБМЕН ОПЫТОМ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.151.514-02:616.153:577.161.5]-008.64-053.3

Гордеева О.Б.¹, Тепаев Р.Ф.^{1,2}, Ботвиньева В. В.¹, Ботвиньев О.К.², Симонова О.И.¹, Горинова Ю.В.¹

ВИТАМИН К-ЗАВИСИМЫЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ПЕРИОДА НОВОРОЖДЕННОСТИ

¹ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия;²ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва, Россия

Витамину К отводится особая роль в системе свертывания крови, так как этот витамин необходим для синтеза в печени факторов свертывания крови (ФII, ФVII, ФIX, ФX), протеинов С и S. Витамин К созревает у новорожденного к определенному времени и содержание витамин К-зависимых факторов к 6-месячному возрасту ребенка должно достичь нормы взрослого человека. Наиболее частыми осложнениями нарушений в синтезе витамин К-зависимых факторов являются геморрагические синдромы. В последнее время отмечен рост случаев геморрагических состояний не только у новорожденных, но и у детей раннего возраста из-за отсутствия профилактики дефицита витамина К в роддоме. Возникает проблема – как связать эти состояния с витамин К-зависимым дефицитом факторов свертывания крови и каковы факторы риска развития этих состояний? В статье проанализированы наблюдения геморрагических состояний, развившихся после периода новорожденности у больных различными хроническими заболеваниями.

К л ю ч е в ы е с л о в а: геморрагический синдром; витамин К; гемостаз; дети.

Для цитирования: Гордеева О.Б., Тепаев Р.Ф., Ботвиньева В.В., Ботвиньев О.К., Симонова О.И., Горинова Ю.В. Витамин К-зависимые геморрагические состояния у детей после периода новорожденности. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 54-56. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-54-56

Gordeeva O.B.¹, Tepaev R.F.^{1,2}, Botvineva V.B.¹, Botvinev O.K.², Simonova O.I.¹, Gorinova Yu.V.¹

VITAMIN K DEPENDENT HEMORRHAGIC CONDITIONS IN INFANTS AFTER THE NEWBORN PERIOD

¹Scientific Center of Children's Health, Moscow, 119991, Russian Federation;²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russian Federation

Vitamin K plays a special role in the blood clotting system, as this vitamin is essential for the synthesis of coagulation factors (II, VII, IX, X, proteins C and S) in the liver. Vitamin K in newborns matures to a certain time and the level of vitamin K dependent factors to the age of 6 months should achieve the standards of an adult human. The most frequent complications of abnormalities in the synthesis of vitamin K-dependent factors are hemorrhagic syndromes. There has recently been an increase in cases of hemorrhagic conditions not only in newborns but also in children of early age due to the lack of prevention of vitamin K deficiency at birth. The article analyzes the observation of hemorrhagic conditions developed after the neonatal period in patients with various chronic diseases.

К е y w o r d s: hemorrhagic syndrome; vitamin K; hemostasis; children.

For citation: Gordeeva O.B., Tepaev R.F., Botvineva V.B., Botvinev O.K., Simonova O.I., Gorinova Yu.V. Vitamin K dependent hemorrhagic conditions in infants after the newborn period. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfusiology)*. 2016; 61(1): 54-56. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-54-56

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding: The study had no sponsorship.

Received 16 September 2015

Accepted 11 February 2016

Витамин К – жирорастворимый витамин, необходимый для синтеза в печени факторов свертывания крови (ФII, ФVII, ФIX, ФX), протеинов С и S, существует в трех фракциях: природный витамин К₁-филлохинон (его источник – зеленые растения), К₂-менахинон (содержится в продуктах животного происхождения, продуцируется микрофлорой кишечника) и синтетический препарат менадион (викасол), аналогичный витамину К₃. Витамин К очень плохо проникает через плаценту, и содержание его в пуповинной крови всегда ниже, чем

Для корреспонденции:

Гордеева Ольга Борисовна, кандидат мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия. E-mail: obr@yandex.ru.

For correspondence:

Gordeeva Olga B., MD, PhD, Senior Research Officer of Laboratory of Experimental Immunology and Virology the Laboratory of Experimental Immunology and Virology of Scientific Center of Children's Health. 1199961, Moscow, Russian Federation. E-mail: obr@yandex.ru.

Information about author:

Gordeeva O.B., <http://orcid.org/0000-0001-8311-9506>.

в крови матери. Этот витамин созревает у новорожденного к определенному времени и поэтому концентрация витамин К-зависимых факторов к 6 мес должна дойти до нормы взрослого человека [1]. Таким образом, у новорожденных наблюдается физиологический дефицит витамина К. У здоровых доношенных младенцев запаса витамина К достаточно для остановки кровотечения. Остальным детям (из групп риска) может потребоваться дополнительное введение менадиона. Наиболее частым заболеванием в результате этих нарушений является геморрагическая болезнь новорожденных (ГБН), P.53 по международной классификации болезней МКБ-10 [2].

Выделяют три формы ГБН:

- *ранняя*, встречается редко и характеризуется появлением симптомов кровоточивости в 1-е сутки после рождения;
- *классическая*, развивается чаще на 2–5-е сутки жизни у новорожденных, находящихся на грудном вскармливании и имеющих нарушенное кишечное всасывание;
- *поздняя*, развивается в возрасте от 2 нед до 6 мес после рождения при неадекватном поступлении витамина К (низкое содержание витамина К в грудном молоке) или из-за нарушенной абсорбции его при заболеваниях печени и желчных путей; поздняя форма витамин К-зависимых кровотече-

ний чаще встречается у мальчиков, чем у девочек [3].

Особенностью данного заболевания является выраженная вариабельность клинических проявлений (проявления геморрагического синдрома) от легкого до тяжелого течения, что определяется выраженностью дефицита витамин К-зависимых факторов. Проявления в легкой форме (кровотечения в склеры, небольшое кровотечение из пупочной ранки) не всегда учитываются при постановке диагноза. В последнее время отмечается рост случаев геморрагических состояний не только у новорожденных, но и у детей после периода новорожденности. Для позднего возникновения геморрагических состояний вследствие дефицита витамина К характерно сочетание трех факторов: отсутствие профилактики геморрагических состояний, грудное вскармливание ребенка и синдром холестаза.

Существует множество факторов, способствующих развитию дефицита витамина К в организме [4]. К основным причинам со стороны матери относят: прием во время беременности лекарственных препаратов (антикоагулянтов непрямого действия, противосудорожных препаратов, антибиотиков широкого спектра действия, противотуберкулезных средств), проявления гестоза, гепатопатии и энтеропатии, патология в родах (хроническая гипоксия и асфиксия плода в родах, роды путем кесарева сечения), наследственный дефицит витамин К-зависимых факторов, диета, обедненная продуктами, содержащими витамин К. Для ребенка выделяют следующие факторы риска: отсутствие профилактики дефицита витамина К, недоношенность, отсутствие или недостаточный объем грудного вскармливания, подавление микробной флоры кишечника, образующей витамин К, вследствие антибактериальной терапии, длительное отсутствие в пище жиров, необходимых для всасывания витамина К, нарушение всасывания витамина К, атрезия желчевыводящих путей, кистозный поджелудочной железы, синдром сгущения желчи, наследственная предрасположенность [5].

В последнее время участились случаи повышенной кровоточивости у детей после периода новорожденности. Возникает проблема – как связать эти состояния с витамин К-зависимым дефицитом факторов свертывания крови и каковы факторы риска развития этих состояний?

Цель работы: проанализировать клинико-лабораторные данные детей с витамин-К зависимым геморрагическим синдромом и оценить эффективность терапии менадионом.

Клиническая характеристика и показатели коагулограммы у больных детей

Больной	Возраст на момент обследования	Анамнез; основной диагноз	Особенности геморрагических проявлений	Показатели коагулограммы	Лечение	Динамика
Больной Р.	7 мес	Обструктивный мегауретер; абсцесс слева в 4 мес; параназальный (полисегментарная двусторонняя пневмония) Антибактериальная терапия	Кровоточивость из мест забора крови (кисть, пальцы)	Протромбин по Квику 0%; ПВ 240 с; АЧТВ 77,9 с; ФП 4%; ФВП 4%; ФХ 5%; ФХ 2%; ФВП 85%	1% раствор менадиона (выкасола), 5 мг/кг разовая доза в/в 2 раза в сутки Через 1 сутки ввели еще 5 мг 1% раствора менадиона однократно в/в	Кровоточивость прекратилась в течение 5 ч после введения препарата Нормализация показателей коагулограммы на 2-е сутки Протромбин по Квику 84%; ПВ 14,3 с; АЧТВ 32 с; ФП 58%; ФВП 64%; ФХ 61%; ФХ 52%
Больная Ш.	1 мес	При осмотре хирургом короткой уздечки языка произошло травмирование слизистой оболочкой рта	Кровянистые выделения из уздечки языка, постепенно усиливающиеся; через 3 дня появление темного окрашивания стула и 2 экхимоза, диаметром 1,5–2 см на груди и спине Кровотечение из мест венепункции в течение 30 мин	Протромбин по Квику 2%; ПВ 240 с; АЧТВ 180 с; ФП 9%; ФВП 5%; ФХ 2%; ФХ 4%; ВФ 157% ФВП 79%	1% раствор менадиона (выкасола) 1 мг/кг, в/м, однократно через 12 ч повторное введение менадиона в той же дозе	Через 2 ч прекратились кровянистые выделения из области уздечки языка, нормализация показателей коагулограммы через 12 ч после введения препарата Протромбин по Квику 82%; ПВ 12,1 с; АЧТВ 29 с; ФП 53%; ФВП 66%; ФХ 71%; ФХ 60%
Больной Б.	1,5 мес	Ребенок от родственного брака; беременность, осложненная гестозом; холестаза у ребенка	Носовое кровотечение	Протромбин по Квику 0%; ПВ > 240с; АЧТВ > 180 с; ФП 5%; ФВП 4%; ФХ 4%; ФХ 9%; ФВП 72%	1% раствор менадиона 1 мг/кг в/м, однократно	Кровотечения не было; нормализация показателей наблюдалась в первые сутки Протромбин по Квику 75%; ПВ 12 с; АЧТВ 31 с; ФП 59%; ФВП 68%; ФХ 75%; ФХ 62%
Больная А.	4 мес	У отца синдром Жильбера, у ребенка дисхольгия	Пупочная ранка кровоточила до 1 мес; в 3,5 мес кровоточила ранка на ухе, экхимозы на теле; в 4 мес появились гематомы на щеке, бедре, в местах соприкосновения с подгузником	ПВ > 240 с; АЧТВ 100 с; ФВ 130%; ФП 7%; ФВП 3%; ФХ 2%; ФХ 5% ФВП 93%	1% раствор менадиона 1 мг/кг в/м, 2 раза в сутки с интервалом в 12 ч	После введения менадиона свежих геморагических проявлений не наблюдалось, нормализация показателей в 1-е сутки Протромбин по Квику 77%; ПВ 15,3 с; АЧТВ 30,1 с; ФП 62%; ФВП 66%; ФХ 74%; ФХ 63%
Больная М.	7 мес	Муковисцидоз (смешанная форма), тяжелое течение, дыхательная недостаточность 2-й степени; пневмония; хроническая сингетная инфекция; антибактериальная терапия	Носовое кровотечение, кровоточивость из места постановки катетера, правосторонний гемоторакс (вероятно на фоне разрыва буллы легкого)	Протромбин по Квику 60%; ПВ 75 с; АЧТВ 120 с; ФП 9%; ФВП 9%; ФХ 12%; ФХ 8%; ФВП 89%	1% раствор менадиона 1 мг/кг, разовая доза в/в 2 раза в сутки в течение первых суток развития геморрагического синдрома	Геморрагический синдром купировался; нормализация показателей гемостаза в первые сутки Протромбин по Квику 88%; ПВ 13,3 с; АЧТВ 34 с; ФП 85%; ФВП 63%; ФХ 66%; ФХ 57%
Больная К.	7 мес	Муковисцидоз (смешанная форма) недоношенности; роды путем кесарева сечения; пневмония антибиотикотерапия	Носовое кровотечение	Протромбин по Квику 48%; ПВ 35 с; АЧТВ 70 с; ФП 10%; ФВП 7%; ФХ 11%; ФХ 14%; ФВП 76%	1% раствор менадиона 1 мг/кг в/м, однократно	Нормализация показателей гемостаза в первые сутки Протромбин по Квику 71%; ПВ 12,4 с; АЧТВ 33 с; ФП 88%; ФВП 78%; ФХ 66%; ФХ 69%
Больной М.	2 года 6 мес	Врожденный порок развития легких; синдром Вильямса-Кумбелла; ДН 2–3-й степени; полисегментарная пневмония недоношенности (3,5 нед); антибиотикотерапия	Кровоточивость из мест инъекций на 4-е сутки в стационаре	Протромбин по Квику 46%; ПВ 35 с; АЧТВ 57 с; ФП 19%; ФВП 11%; ФХ 15%; ФХ 12%; ФВП 84%	1% раствор менадиона 1 мг/кг в/м, однократно	Нормализация показателей гемостаза через 12 ч Протромбин по Квику 89%; ПВ 12,3 с; АЧТВ 35 с; ФП 57%; ФВП 63%; ФХ 74%; ФХ 68%

Материал и методы

В условиях стационара в период с 2013 по 2014 г. было обследовано 80 детей старше 1 мес жизни до 1 года, находившихся на лечении по поводу различных заболеваний. Геморрагический синдром выявлен у 25 детей, из них обусловленный дефицитом витамина К-зависимых факторов – у 7 пациентов. В анамнезе у этих детей выявлено отсутствие профилактического введения витамина К. В настоящее время в роддомах препарат витамина К вводят только детям из групп риска. В периоде новорожденности геморрагических проявлений у них не выявлено. У всех детей определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), содержание протромбина по Квику, факторов свертывания крови (ФП, ФХ, ФVII, ФIX), содержание тромбоцитов, концентрацию фибриногена, активность фактора Виллебранда (ФВ) и ФVIII с помощью автоматического коагулометра STA Compact ("Stago", Франция).

Дефицит витамина К предполагали при снижении витамин К-зависимых факторов и нормальном содержании ФVIII. Диагноз устанавливали на основании совокупности анамнестических (наличие факторов риска), клинических данных и подтверждали лабораторными исследованиями. У наблюдаемых пациентов были выявлены изменения в коагулограмме в виде гипокоагуляции по внутреннему пути, что соответствовало удлинению АЧТВ, гипокоагуляции по внешнему пути (удлинению ПВ), снижения содержания протромбина по Квику (меньше 60%), снижения активности витамин К-зависимых факторов свертывания. При этом количество тромбоцитов оставалось в норме наряду с нормальным уровнем активности ФВ и ФVIII [6]. В связи с геморрагическим синдромом детям вводили 1% раствор менадиона (викасол) внутримышечно (в/м) или внутривенно (в/в) из расчета 1 мг/кг массы тела (разовая доза). После введения оценивали динамику геморрагического синдрома и показатели гемостаза.

Результаты

Анализ не выявил геморрагических состояний до 1 мес жизни детей. Пол, возраст, клиническая характеристика и лабораторные данные представлены в **таблице**.

Полученные данные указывают на то, что у всех детей были значительно снижены показатели, зависящие от витамина К. Независимые от витамина К показатели гемостаза (тромбоциты, ФВ, ФVIII) не отражали состояния гипокоагуляции и находились в пределах референсных величин. Содержание тромбоцитов колебалось от 282 до 636 × 10⁹/л.

Среди пациентов были 2 ребенка с генетическим заболеванием (муковисцидоз легочно-кишечной формы), 2 – с врожденными пороками развития. У 2 детей выявлена роль наследственных факторов (родственный брак и болезнь Жильбера). Характерно, что эти заболевания сопровождаются нарушением функции печени. Полученные данные позволяют говорить о связи генетических факторов с уровнем синтеза витамин К-зависимых факторов свертывания крови. Возраст детей был в основном от 1 до 7 мес, лишь 1 пациент был в возрасте 2 года 6 мес. Не исключено, что ранее у него имелись клинические признаки геморрагического синдрома, но в медицинской документации об этом не было указаний. Введение менадиона (викасола) наблюдаемым нами больным приводило к выраженному положительному клиническому эффекту и нормализации показателей коагулограммы в течение 1–2 сут наблюдения.

Обсуждение

У детей раннего возраста наблюдается более низкое содержание факторов свертывания крови вследствие нарушенного созревания некоторых органов и систем, в частности, системы гемостаза. Факторами риска являются генетические факторы, острые и хронические тяжелые заболевания, антибиотикотерапия. Геморрагический синдром у них протекает по типу криза. Это можно объяснить тем, что у детей с генотипическими отклонениями нарушены процессы синтеза витамин К-зависимых факторов свертывания крови. В этом случае устойчивость подобных систем снижена. Созревание функциональных систем ребенка зависит от его генотипа, а нарушения со стороны генетической конституции ребенка приводят к дефектам созревания, к недоразвитию его систем

[7]. При воздействии каких-либо неблагоприятных факторов эндогенной или экзогенной природы у детей из групп риска наблюдается дефицит витамин К-зависимых факторов свертывания крови, особенно при заболеваниях печени (синдром Жильбера, холестаза). Клинически это проявляется развитием геморрагических состояний, что мы и наблюдали у наших пациентов [8].

Проведенные наблюдения дают возможность говорить о том, что факторы риска развития геморрагических состояний у детей после периода новорожденности имеют мультифакторную природу. Ведущими являются генотипические особенности ребенка и неблагоприятные факторы внешней среды (тяжелые инфекционные заболевания, длительная антибиотикотерапия) [9].

Детям из групп риска необходимо проводить исследование параметров коагулограммы для оценки степени нарушений активности витамин К-зависимых факторов свертывания крови, а также своевременную коррекцию этих нарушений. Не следует забывать и о профилактическом введении препарата витамина К пациентам с хроническими заболеваниями.

Викасол (витамин К₃) в Европе и США не используется из-за низкой эффективности и токсичности. В большинстве стран применяют фитоменадион (витамин К₁), эффективность которого установлена и превышает эффективность менадиона. Однако в России он не зарегистрирован. Анализ собственного материала демонстрирует купирование геморрагического синдрома в течение первых суток от момента использования менадиона в 100% случаев и нормализацию показателей витамин К-зависимых факторов, что позволило не использовать дорогостоящий концентрат протромбинового комплекса. Геморрагический синдром, обусловленный дефицитом витамин К-зависимых факторов не является столь редким состоянием, особенно при отсутствии профилактики дефицита витамина К в роддомах.

Финансирование: Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Момот А.П. *Патология гемостаза*. СПб: Формат; 2006.
2. *Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем*. МКБ-10. М.: Медицина; 2003. т.1.
3. Шабалов Н.П. *Неонатология*. М.: Медпресс-информ; 2009.
4. Баркаган З.С., Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия нарушенной гемостаза*. М.: Ньюдиамед; 2001.
5. Weston B.W., Monahan P.E. Familial deficiency of vitamin K-dependent clotting factors. *Haemophilia*. 2008; 14(6): 1209–13. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01811.x
6. Долгов В.В., Свиринов П.В. *Лабораторная диагностика нарушений гемостаза*. М.: Триада; 2005.
7. Ботвиньев О.К. *Системный анализ связей между фенотипическими признаками и состоянием здоровья детей*. Автореф. дис. ... д-р мед. наук. М.; 1985.
8. Заплатников А.Л., Дмитриева Ю.А., Шишкина С.В., Катаева Л.А., Бражникова О.В., Гавела Н.В. Поздняя геморрагическая болезнь новорожденного. *Российский медицинский журнал*. 2014; 21: 1547–50.
9. Ozdemir M.A. Late-type vitamin K deficiency bleeding: experience from 120 patients. *Childs Nerv. Syst.* 2012; 28(2): 247–51.

REFERENCES

1. Momot A.P. *Pathology of hemostasis*. St.Peterburg: Format; 2006. (in Russian)
2. *International statistical classification of diseases and problems related to health*. ICD 10. Moscow: Meditsina; 2003. vol.1. (in Russian)
3. Shabalov N.P. *Neonatology*. Moscow: Medpress-inform; 2009. (in Russian)
4. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnostics and controlled therapy of disorders of hemostasis*. Moscow: Nyudiamed; 2001. (in Russian)
5. Weston B.W., Monahan P.E. Familial deficiency of vitamin K-dependent clotting factors. *Haemophilia*. 2008; 14(6): 1209–13. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01811.x
6. Dolgov V.V., Svirin P.V. *Laboratory diagnosis of disorders of hemostasis*. Moscow: Triada; 2005. (in Russian)
7. Botviniyev O.K. *Systematic analysis of the links between phenotypic characteristics and health status of children*. Dis. Moscow; 1985. (in Russian)
8. Zaplatnikov A.L., Dmitriyev Y.A., Shishkin S.V., Kataeva L.A., Brazhnikova O.V., Gavela N. Late hemorrhagic disease of the newborn. *Medical Journal of the Russian Federation (Rossiyskii meditsinskii zhurnal)*. 2014; 21: 1547–50. (in Russian)
9. Ozdemir M.A. Late-type vitamin K deficiency bleeding: experience from 120 patients. *Childs Nerv. Syst.* 2012; 28(2): 247–51.

Поступила 16.09.15
Принята к печати 11.02.16