

ГЕМАТОЛОГИЯ и ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ

3' 2016

КВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1956 ГОДА

ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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. Таджикиев*

Художественный редактор
М. В. Козлова

Корректор *М. В. Козлова*

Верстка *С. М. Мешкорудникова*

Сдано в набор 10.07.16.

Подписано в печать 27.07.16.

Формат 60 x 88 1/8.

Печать офсетная.

Печ. л. 7,00.

Усл. печ. л. 6,86.

Уч.-изд. л. 7,35.

Заказ 400.

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. 2016.

Т. 61. № 3, 113–168.

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. РАЕН, доктор биол.
наук, профессор
Голенков 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 Саиджалол Махмудович (Ташкент, Республика Узбекистан), Новак
Василий Леонидович (Львов, Украина), Перехрестенко Петр Михайлович
(Киев, Украина)



GEMATOLOGIYA i TRANSFUZIOLOGIYA

3' 2016

FREQUENCY 4 ISSUES PER YEAR

HEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

FOUNDED IN 1956

JULY—SEPTEMBER VOL. 61

Founder of the Journal Hematology Research Center, 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), Novak Vasily L. (Lviv, Ukraine), Perehrestenko Peter M. (Kiev, Ukraine)

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

РЕДАКЦИОННАЯ СТАТЬЯ

- Воробьев А.И., Васильев С.А., Городецкий В.М., Шевелев А.А., Горгидзе Л.А., Кременецкая О.С., Шкловский-Корди Н.Е.* Гиперкоагуляционный синдром: классификация, патогенез, диагностика, терапия..... 116-122

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Савченко В.Г., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Туркина А.Г., Кузьмина Л.А., Сорокина Т.В., Паровичникова Е.Н.* Модификация стромального микроокружения у больных лейкозами до и после терапии..... 122-126
- Сорокина Т.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.* Изменение уровней экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, полученных из костного мозга больных острыми лейкозами в процессе терапии..... 126-133
- Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Баторова Д.С., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р.* Восстановление CD4⁺ T-клеток, экспрессирующих молекулу CD31, у больных лимфопролиферативными заболеваниями после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток..... 133-137
- Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И., Максимов В.Н.* Результаты комплексного анализа статуса гена TP53 у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой..... 138-143
- Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Васильев Е.В., Ольховский И.А.* Роль полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 в патогенезе хронических миелопролиферативных заболеваний..... 143-145
- Танашян М.М., Кузнецова П.И., Суборцева И.Н., Шабалина А.А., Лагода О.В., Меликян А.Л.* Хроническая и острая цереброваскулярная патология при Rh-негативных миелопролиферативных заболеваниях..... 146-150
- Божбанбаева Н.С., Сатбаева Э.М., Сейталиева А.М., Алтынбаева Г.Б., Сулейменова И.Е., Пичхадзе Г.М.* Опыт повторного введения витамина К для профилактики геморрагического синдрома у недоношенных детей..... 150-153
- Петрова О.В., Шабанова Г.Р., Егорова Т.Г.* Референтные интервалы количества лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формулы у взрослого населения при применении автоматического гематологического анализатора Sysmex XT 2000i..... 153-156
- Лучинина Ю.А., Гончарова М.В., Сурич В.Л., Иващенко Т.Э., Густовойт Я.С., Карпова И.В., Кравченко С.К.* Ассоциация аллельных вариантов генов системы детоксикации с клиническим проявлением острой перемежающейся порфирии..... 156-160

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- Будневский А.В., Цветикова Л.Н., Воронина Е.В., Овсянников Е.С., Жусина Ю.Г., Лабжаня Н.Б.* Эритроферрон как эритроидный регулятор обмена железа..... 161-163

ЮБИЛЕИ И ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

- Абдулганиева Д.И., Бомбина Л.К., Назарова М.Д., Халфина Т.Н.* К 140-летию профессора Н.К. Горяева..... 164-166
- К 90-летию профессора Натальи Сергеевны Кисляк (на обложке)

НЕКРОЛОГИ

- Памяти Валентина Андреевича Журавлева..... 167
- Памяти Лева Иосифовича Идельсона..... 168

EDITORIAL

- Vorobiev A.I., Vasiliev S.A., Gorodetskiy V.M., Shevelev A.A., Gorgidze L.A., Kremenetskaya O.C., Shklovskiy-Kordi N.E.* Hypercoagulation syndrome: classification, pathogenesis, diagnostics, and therapy

ORIGINAL ARTICLES

- Savchenko V.G., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Turkina A.G., Kuzmina L.A., Sorokina T.V., Parovichnikova E.N.* Modification of gene expression in mesenchymal stromal cells of the acute myeloid leukemia patients during chemotherapy
- Sorokina T.V., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.* Modification of gene expression in mesenchymal stromal cells of the acute myeloid leukemia patients during chemotherapy
- Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Batorova D.S., Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.* Recovery of CD4⁺ CD31⁺ T-cell in patients with lymphoproliferative disorders following hematopoietic stem cell transplantation
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N.* The results of complex analysis of TP53 gene status in patients with diffuse large cell lymphoma
- Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Vasiliev E.V., Olkhovskiy I.A.* Significance of the XRCC1 gene Arg399Gln polymorphism in the pathogenesis of the chronic myeloproliferative diseases
- Tanashyan M.M., Kuznetsova P.I., Subortseva I.N., Shabalina A.A., Lagoda O.V., Melikyan A.L.* Chronic and acute cerebrovascular pathology in patients with Ph-negative myeloproliferative diseases
- Bozhbanbayeva N.S., Satbaeva E.M., Seyталиева A.M., Altynbayeva G.B., Suleimenova I.E., Pichkhadze G.M.* The experience of the repeated administration of vitamin K for the prevention of hemorrhagic syndrome in premature infants
- Petrova O.B., Shabanova G.R., Egorova T.G.* Reference intervals for the white blood cell and differential white blood cell count in the adult population at the use of the automatic hematology analyzer Sysmex XT 2000i
- Luchinina Yu.A., Goncharova M.V., Surin V.L., Ivashchenko T.E., Pustovoyt Ya.S., Karpova I.V., Kravchenko S.K.* Association of allelic variants of genes of detoxification system with clinical presentation of acute intermittent porphyria

REVIEW OF LITERATURE

- Budnevskiy A.V., Tsvetikova L.N., Voronina E.V., Ovsyannikov E.S., Zhulina Yu.G., Labzhaniya N.B.* Erythroferrone as erythroid regulator of iron

ANNIVERSARIES AND MEMORABLE DATES

- Abdulganieva D.I., Bombina L.K., Nazarova M.D., Khalfina T.N.* On the occasion of the 140th anniversary of the birth of the Professor N.K. Goryaev
- On the 90th anniversary of the Professor of Natalia Kislyak

OBITUARY

- In memory of Valentin Andreevich Zhuravlev
- In memory of Lev Iosifovich Idelson

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

РЕДАКЦИОННАЯ СТАТЬЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.151.511-008.6-092-085

Воробьев А.И.¹⁻³, Васильев С.А.^{2,3}, Городецкий В.М.³, Шевелев А.А.², Горгидзе Л.А.²,
Кременецкая О.С.¹, Шкловский-Корди Н.Е.²**ГИПЕРКОАГУЛЯЦИОННЫЙ СИНДРОМ:
КЛАССИФИКАЦИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА, ТЕРАПИЯ**¹ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, 119991, г. Москва, Россия;²ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия;³Кафедра гематологии и трансфузиологии ГБОУ ВПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Гиперкоагуляционный синдром (ГКС) – очерченная коагулопатия, характеризующаяся повышенной готовностью к тромбозу, с клинико-лабораторными признаками гиперкоагуляции и активации факторов свертывания крови, но без наличия острого тромбоза. ГКС сопутствует многим патологическим состояниям (эритроцитозу, гипертромбоцитозу, повреждениям эндотелиальной сосудистой стенки различной этиологии – травматической, воспалительной, атеросклеротической, антифосфолипидному синдрому, опухолям и др.). Отсутствие коррекции патологических состояний, являющихся причиной ГКС, может привести к развитию острого тромбоза, инфаркта, инсульта. Лечение гиперкоагуляционного синдрома практически всегда включает в себя и терапию основного заболевания.

Ключевые слова: гиперкоагуляционный синдром; диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови; тромбофилия; тромбоз; антиагреганты; антикоагулянты; терапия.

Для цитирования: Воробьев А.И., Васильев С.А., Городецкий В.М., Шевелев А.А., Горгидзе Л.А., Кременецкая О.С., Шкловский-Корди Н.Е. Гиперкоагуляционный синдром: классификация, патогенез, диагностика, терапия. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 116-122. DOI:10.18821/0234-5730-2016-61-3-116-122

Vorobiev A.I.¹, Vasiliev S.A.¹, Gorodetskiy V.M.², Shevelev A.A.¹, Gorgidze L.A.¹, Kremenetskaya O.C.², Shklovskiy-Kordi N.E.¹

HYPERCOAGULATION SYNDROME: CLASSIFICATION, PATHOGENESIS, DIAGNOSTICS, AND THERAPY¹National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation;²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, 123995, Russian Federation

Hypercoagulation syndrome is the expressed coagulopathy characterized by the increased readiness to thrombosis with clinical and laboratory evidence for a blood hypercoagulable state and activation of blood clotting factors, but without acute thrombosis. Hypercoagulation syndrome is associated with several pathological conditions (erythrocytosis, hyperthrombocytosis, lesions of the blood vessel wall due to trauma, inflammation, atherosclerosis, antiphospholipid syndrome, tumors, etc.). The management of hypercoagulation syndrome is specific in every case, but almost always requires the treatment of the essential disease, antiaggregation and anticoagulation therapy, often – plasmapheresis, fresh-frozen plasma transfusions, glucocorticoids. The lack both of correction of pathological states causing hypercoagulation syndrome, permanent physician care in chronic hypercoagulation syndrome and timely measures for its correction can lead to the development of acute thrombosis, infarction, stroke which pose the real danger for the life of the patient.

Key words: hypercoagulation syndrome; thrombophilia; thrombosis; antiaggregants; anticoagulants; therapy.

For citation: Vorobiev A.I., Vasiliev S.A., Gorodetskiy V.M., Shevelev A.A., Gorgidze L.A., Kremenetskaya O.C., Shklovskiy-Kordi N.E. Hypercoagulation syndrome: classification, pathogenesis, diagnostics, and therapy. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(3): 116-122. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-116-122

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

Funding. The study was supported by the Grant of the President of Russian Federation on the support research of young Russian scientists, doctors and state support of leading scientific schools of the Russian Federation, Moscow, 1998 (Hematology, morphology, cell-molecular biology and intensive care in the internal medicine clinic, No SS96-15-98100) and the Grants of RFBR: “The concept of building a unified information space and transfusion management processes for patient safety in transfusion of blood components”, No13-07-00967; “Development of approaches to the creation of a unified information space for medicine”, No 13-07-00847; “Create an integrated interactive medical system doctor-patient (MIS-VP) on the basis of access to “personal electronic medical record”, 14-07-00904; “Intelligent methods of analysis and presentation of health data: support for decision-making and improving the system of national standards in the framework of a common information space of Healthcare” 16-29-12998; “Integrating new technologies into a unified information space of Health care on the basis of the system for processing of personal electronic medical records”, No 16-07-01140, “Integrating new technologies into a unified information space of Health care on the basis of the system for processing of personal electronic medical records”, No 16-07-01047A.

Received 30 Jan 2016

Accepted 17 July 2016

Гиперкоагуляционный синдром (ГКС) – достаточно строго очерченная коагулопатия, характеризующаяся повышенной готовностью к тромбозу, клинико-лабораторными признаками гиперкоагуляции, активации различных факторов и компонентов свертывания, снижением фибринолиза, но без наличия острого тромбоза [1, 2].

Классификация форм гиперкоагуляционного синдрома представлена в табл. 1.

Клинико-лабораторные проявления ГКС характеризуются множественными признаками. При повышении концентрации тромбоцитов и/или эритроцитов в крови (например, истинном, как при полицитемии, или относительном вследствие сгущения крови, вызванном применением диуретиков) ГКС характеризуется эритроцитозом, гипертромбоцитозом, стазами крови в микроциркуляторном русле, что чревато блокадой микроциркуляции и развитием органной недостаточности [1–3].

Для корреспонденции:

Шкловский-Корди Никита Ефимович, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. 125167, г. Москва, Россия. E-mail: nikitashk@gmail.com.

For correspondence.

Shklovskiy-Kordi Nikita E., BD, PhD, leading researcher of the Department of Hematology and Intensive Therapy of the National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: nikitashk@gmail.com.

Information about authors:

Vorobiev A.I., <http://orcid.org/0000-0003-2531-1561> Researcher ID: L-2684-2013; Gorodetskiy V.M., <http://orcid.org/0000-0001-6226-9329>; Shevelev A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5480-6374>; Shklovskiy-Kordi N.T., <http://orcid.org/0000-0002-1413-1154>, Researcher ID is: F-7980-2016.

Таблица 1

Формы гиперкоагуляционного синдрома

Форма ГКС	Признаки
Индукцированная тромбоцитозом и/или эритроцитозом	Сгущение крови за счет клеточных элементов
Эндотелиопатическая	Лабораторно-клинические проявления повреждения эндотелия сосудов
Тромбофилическая	Наследственные и приобретенные тромбофилии
Контактная	Активация свертывания вследствие контакта крови с чужеродными поверхностями
Травматическая	Активация свертывания крови при травме
Тромбоцитопеническая	Активация гемокоагуляции при тромбоцитопенических состояниях
Акушерско-гинекологическая	Активация гемостаза при беременности, родах и гинекологических заболеваниях
Опухолевая	Активация гемостаза при раковых, солидных опухолях
Онкогематологическая	Активация гемостаза при гемобластозах и лимфомах
Гемодинамическая	Появление турбулентных потоков крови в сосудах
Атеросклеротическая	Гиперкоагуляция, обусловленная атеросклерозом. Предшествует атеротромбозу
Стрессовая	Коагуляционно-сосудистая реакция на повышение уровня катехоламинов при стрессовых состояниях
Смешанная	Сочетание нескольких форм ГКС у одного больного
Ювенильная	Формирование ГКС у пациентов в возрасте до 18 лет
Сенильная	Формирование ГКС у пациентов в возрасте от 60 лет и старше
Посттромботическая (посттромботическая болезнь)	Активация гемостаза после перенесенного тромботического заболевания

ГКС при эндотелиопатии наблюдается при различных повреждениях эндотелия или неполноценности эндотелиальных клеток. Подобный вариант ГКС развивается при травме сосудистой стенки, тяжелых инфекциях, болезнях, обусловленных циркулирующими иммунными комплексами, аутоиммунных заболеваниях, атеросклеротическом поражении сосудов, отравлениях, лечении цитостатиками и воздействии ионизирующей радиации [4].

При многих наследственных и приобретенных тромбофилиях наблюдается развитие ГКС. В частности, он описан при дефиците антитромбина III (АТIII), дефиците и аномалии протеинов С и S, мутантном факторе V Leiden, мутации гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*МТТФР*), гипергомоцистеинемии, мутантном протромбине G20210A, антифосфолипидном синдроме [4].

Кроме этого, ГКС часто регистрируют при наличии в крови волчаночного антикоагулянта, обнаружении антител к кардиолипину IgM, IgG, β_2 -гликопротеину, IgM, IgG, гиперагрегабельности тромбоцитов, повышении уровня или мультимерности фактора Виллебранда, дефиците ADAMTS 13, при болезни Мошковица, увеличении активности факторов VIII (ФVIII), FX, FXIII, дефиците FXII (болезни Хагемана), дисфибриногемии [5–9].

При проведении процедур экстракорпорального очищения крови или операций с применением аппаратов искусственного кровообращения существует риск развития ГКС вследствие контакта крови с инородными материалами и поверхностями (протезирование клапанов сердца, ангиопластика) [10, 11].

При травматизации и/или разрыве сосудистой стенки ГКС развивается в результате контакта внесосудистого тканевого тромбопластина с циркулирующей кровью, что приводит к активации многих факторов свертывающей системы крови. При гемофилии, болезни Виллебранда повреждение сосудов сопровождается развитием ГКС при отсутствии полноценного тромбоза. Подобный ГКС мо-

Таблица 2

Варианты течения гиперкоагуляционного синдрома

Временные особенности	Характеристика
Пролонгированное течение	Длительность более 1 нед: может сохраняться несколько недель, месяцев и даже годы
Острое течение	Трансформация ГКС в локальный, множественный или диссеминированный тромбоз в течение минут, часов или 1–3 дней

жет наблюдаться при небольших рецидивирующих кровотечениях вследствие язвы желудка, язвы двенадцатиперстной кишки, неспецифического язвенного колита и др. [1, 2].

Особого внимания требует так называемый акушерский ГКС – часто наблюдаемая патология при осложненном течении беременности. Эта форма ГКС нередко обусловлена тромбофилиями [1, 2, 12].

Развитие ГКС нередко регистрируют при злокачественных опухолях, при которых имеется патологическая индукция тромботических факторов (тканевого тромбопластина, ракового тромбогенного фактора), способствующих гиперкоагуляции [1, 5, 13].

ГКС описан при трансформации кровотока из ламинарного в турбулентный, что наблюдается при стенозировании коронарных, сонных и яремных артерий, сосудов головного мозга, а также при гемангиоматозе (гемангиоэндотелиома, ангиосаркома, синдром Клиппеля–Треноне–Вебера, синдром Казбаха–Мерритта). Стенозирование сосудистых стволов разрастающейся опухолью с прорастанием индуцирует ГКС не только продукцией тромбогенных факторов (тканевого тромбопластина, ракового тромбогенного фактора), но и за счет образования в местах стенозирования локальных турбулентных потоков. Выявлен этот феномен при проведении ультразвукового исследования (УЗИ) проходимости артериальных и венозных сосудов [1].

Стрессовый ГКС развивается вследствие сильного эмоционального возбуждения, при котором происходит резкий выброс в циркуляторное русло катехоламинов (катехоламиновый криз). Как правило, значительный рост концентрации катехоламинов в кровеносном русле происходит при наличии таких неблагоприятных факторов, как трансформация кровотока, атеросклеротическая эндотелиопатия, тромбофилия, избыток клеточных элементов и др., что может приводить иногда к внезапной смерти [1]. ГКС такого смешанного генеза встречается чаще многих других форм этой коагулопатии [1, 2, 14].

К развитию ГКС в общей популяции предрасположены около 5% внешне здоровых людей. ГКС выявляют у 25–35% беременных, у 70–85% лиц пожилого возраста (65–80 лет и старше) [1, 2, 5].

Ювенильный ГКС чаще всего имеет наследственный характер (тромбофилии), существенно реже – приобретенный. Его верификация требует обязательного коагулологического исследования крови [1, 15].

Сенильный (старческий) ГКС отличается многофакторностью причин и сочетанностью коагулологических изменений. Диагностика сенильного ГКС также требует тщательных коагулологических и генетических исследований [1, 5, 16, 17].

Необходимо помнить о так называемом посттромботическом ГКС. После перенесенного нетравматического тромбоза сосудов различной локализации у пациентов развивается ГКС. Если не проводить терапевтическую коррекцию этой патологии, вероятность рецидива тромбозов очень высока (35–40% от общего числа больных) [1, 5, 9, 18, 19].

ГКС может иметь различное течение как в пролонгированном, так и в остром варианте (табл. 2).

Часто ГКС продолжается длительное время: несколько недель, месяцы и даже годы.

При острой форме ГКС тромбоз может развиваться в течение нескольких минут, часов или в течение 1–3 дней. Острый ГКС способен быстро трансформироваться в локальный, множественный или диссеминированный тромботический процесс, что может наблюдаться при затянувшейся эпизод стенокардии, за которым скрывается резкая активация свертывания крови с формированием растворимого фибрин–мономерного комплекса в области атеросклеротической бляшки. Если быстро начата терапия (нитроглицерин, β -блокаторы, аспирин, клопидогрел, нефракционированный гепарин, низкомолекулярный гепарин, экстренный тромболитиз или коронароангиопластика), то тромбоз будет купирован, и угроза развития инфаркта миокарда будет снята.

Острый ГКС может осложниться острым тромбозом сосудов головного мозга и ишемическим инсультом.

Следует еще раз подчеркнуть два принципиальных положения:

- ГКС всегда предшествует развитию острого тромбоза;

Таблица 3

Диагностические критерии гиперкоагуляционного синдрома

Время свертывания крови по Ли–Уайту	Укорочение
АЧТВ	Укорочение
Протромбиновый индекс	Увеличение
Концентрация фибриногена	Увеличение
РФМК	Увеличение до 5–8 мг%
ХПа-зависимый фибринолиз	Замедление от 13 до 50 мин
Тромбоциты	Норма (отсутствует потребление)
Агрегация тромбоцитов	Повышена
Полиорганная недостаточность	Отсутствует

• своевременная диагностика и адекватная терапия ГКС позволяет, как правило, избежать осложнений, нередко летальных.

При диагностике острого ГКС принимают во внимание (табл. 3):

- укорочение времени образования рыхлого и нестойкого сгустка крови в пробирке;
- укороченное время свертывания крови по Ли–Уайту [20];
- укороченное активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) (за исключением случаев волчаночного антикоагулянта, иммунных ингибиторов, дефицита факторов свертывания);
- резко повышенные показатели агрегации тромбоцитов в ответ на добавление агонистов (ристоцетин, АДФ, коллаген, арахидоновая кислота, адреналин, тромбин);
- удлинение времени фибринолиза (так называемый истощенный фибринолиз) до 13–50 мин (норма 4–12 мин).

На тромбозаграмме фиксируется феномен гиперкоагуляции, иногда с рыхлыми краями фиксированного тромба (рис. 1).

При ультразвуковом исследовании венных сосудов ГКС может проявляться в виде феномена выраженного эхоконтраста (рис. 2).

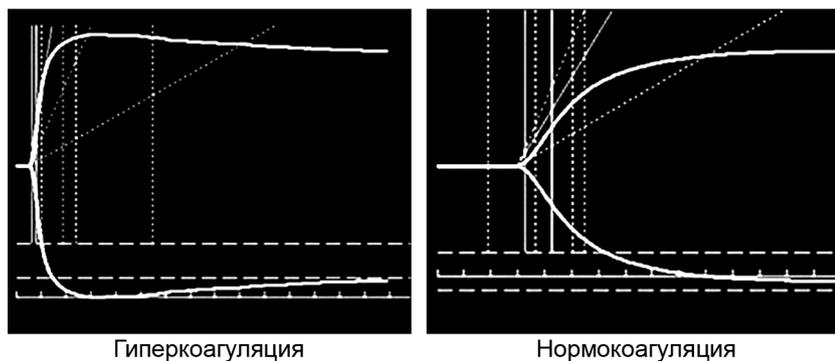


Рис. 1. Тромбозаграмма в норме и при гиперкоагуляционном синдроме.

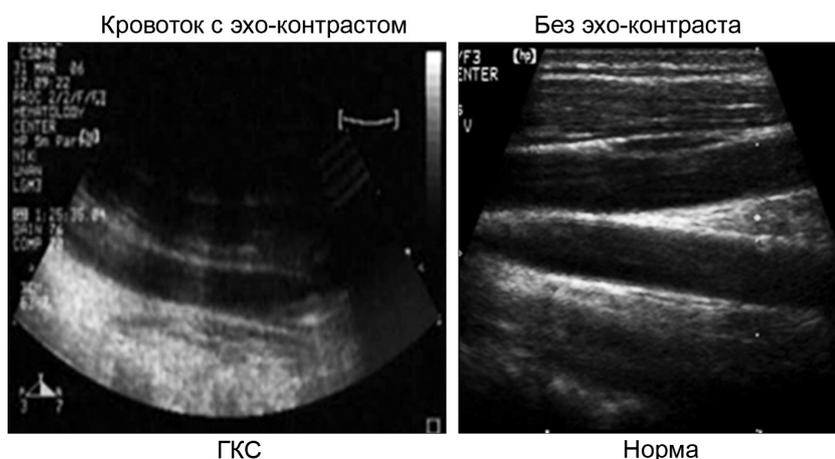


Рис. 2. Ультразвуковое исследование сосудов в норме и при гиперкоагуляционном синдроме (выявляется дополнительный эхо-контраст).

Исследование скорости пространственного роста сгустка (тромбодинамики) выявляет признаки резкой гиперкоагуляции (рис. 3).

Исследования тромбинового потенциала плазмы крови при активации как по внутреннему, так и по внешнему механизму свертывания крови выявляет феномен гипертромбинемии (рис. 4).

При хроническом ГКС может не быть специфической клинической картины, но могут отмечаться преходящие головокружения, чувство тяжести в голове, кратковременные головные боли, заторможенность, быстрая утомляемость, слабость. При пункции вены нередко наблюдается быстрое тромбирование иглы или катетера с последующим развитием тромбофлебита в месте пункции. Могут также отмечаться явления парестезий нижних и верхних конечностей во время сна или длительного вынужденного положения тела [1, 2].

Под воздействием провоцирующего фактора острый ГКС легко переходит в тромботические состояния или в острый ДВС-синдром, который через гиперкоагуляционную фазу может сравнительно быстро перейти в гипокоагуляционную фазу ДВС-синдрома [1, 2, 21–23].

Представляется ошибочным объединять и считать идентичными состояния «гиперкоагуляционный синдром» и «гиперкоагуляционная фаза синдрома ДВС». Различия между этими состояниями существенны, главное из них – при ГКС нет признаков потребления различных компонентов системы гемостаза, обязательных при синдроме ДВС. Различия ГКС и ДВС-синдрома приведены в табл. 4. Очень важно заметить, что и терапия их различна [2, 12, 21].

В случае неадекватной или несвоевременной терапии острого ГКС патологический процесс может осложняться переходом в локальный или диссеминированный тромбоз, что может потребовать проведения лечебного тромболитика (фибринолиза).

Терапевтический фибринолиз имеет свои специфические особенности. При тромбозе церебральных артерий используют рекомбинантный тканевый активатор плазминогена (актилизе, альтеплаза), но стрептокиназа не применяется. При тромбозе легочной артерии находят применение различные фибринолитические препараты: стрептокиназа, урокиназа, рекомбинантный тканевый активатор плазминогена, а также гепарин. Различные фибринолитики применяют для купирования острого ГКС с поражением коронарных сосудов. Лечение фибринолитиками на этапе трансформации острого ГКС в коронаротромбоз наиболее эффективно при условии их использования в первые 4–6 ч после его диагностирования и при условии отсутствия возможности проведения экстренной ангиографии с переходом на ангиопластику [5, 8, 18, 19].

Острый ГКС требует обязательного постоянного присутствия у пациента (как дома, так и с собой) лекарственных средств для предупреждения (купирования) острого угрожающего тромбоза. Можно рекомендовать таким больным иметь своеобразную «аптечку гиперкоагуляционного синдрома» (аптечку ГКС), в которой по назначению врача могут находиться низкомолекулярный гепарин, аспирин, клопидогрел, нитроглицерин, β-адреноблокаторы. Необходимо также рекомендовать больным с хроническим ГКС следить за питьевым режимом и иметь «под рукой» питьевую воду для коррекции возможного сгущения крови во время повышения температуры воздуха, приводящего к гиповолемии.

После эффективного лечения тромбоза по мере rekanализации поврежденных сосудов существует угроза развития посттромботического гиперкоагуляционного синдрома (посттромботической болезни). При отсутствии своевременного достаточно длительного лечения этой формы ГКС в 35–40% случаев наблюдаются рецидивы тромбозов [5, 8, 10, 11, 16, 21]. Профилактическая терапия посттромботического ГКС как минимум должна продолжаться в течение 6–12 мес, но нередко может быть пожизненной.

Острая массивная кровопотеря, осложнившаяся геморрагическим шоком с глубоким падением артериального давления, развитием стазов в микроциркуляторном русле крови, практически всегда сопровождается гиперкоагуляционной фазой ДВС. При эффективном лечении (переливании свежзамороженной плазмы (СЗП) и восстановлении артериального давления) происходит переход гиперкоагуляционной фазы острого ДВС-синдрома в ГКС. Такой переход прослеживается по исчезновению признаков потребления факторов свертывания [2, 12, 21].

При гипокоагуляционной фазе ДВС-синдрома по возможности проводят этиотропную терапию основного заболевания, сочетая ее при наличии показаний, с активным поддержанием функций жизненно важных органов и систем (ИВЛ, гемодиализ) и внутривенным введением больших объемов СЗП (от 25 до 40 мл/кг массы тела в сутки) под контролем уровня центрального венозного давления [2].

После перехода гипокоагуляционной фазы ДВС в гиперкоагуляционную фазу, подтвержденного клинико-лабораторными данными, наряду с продолжением лечения основного заболевания и инструментальной протекцией функций жизненно важных органов проводят непрерывную (используя инфузомат) внутривенную инфузию нефракционированного гепарина в адекватных дозах (от 500 до 1000 МЕ/ч). Целевое удлинение АЧТВ при гепаринотерапии должно составлять 45–50 с. Продолжают периодические трансфузии СЗП с целью поддержания терапевтической концентрации потребляемых плазменных факторов свертывания, особенно лабильных. Показанием для повторных трансфузий СЗП служит высокий уровень потребления факторов свертывания при сниженной концентрации тромбоцитов, протромбина, фибриногена, наличии рыхлого нестабильного сгустка в пробирке и рыхлого сгустка по данным тромбозластографии (ТЭГ) [2, 12].

После перехода гиперкоагуляционной фазы ДВС-синдрома в ГКС лечебная тактика меняется. Терапию проводят с учетом формы ГКС. Применяют комбинации терапевтических средств: внутривенное непрерывное (с помощью инфузомата) введение нефракционированного гепарина, низкомолекулярные гепарины, антикоагулянты (варфарин, дабигатран, ривароксабан, апиксабан, фондапаринукс), сулодексид, антиагреганты (аспирин, клопидогрел, тикагрелор), вазапостан, витамины В₁₂, В₆, фолиевая кислота, нифедипин, никотиновая кислота, антистакс, гесперидин с диосмином, токоферол (витамин Е); в определенных ситуациях – стероидные гормоны, цитостатики, интерферон α, лечебный плазмаферез, цитаферез. Необходимо подчеркнуть, что терапия различных вариантов ГКС является индивидуализированной, специфичной и требующей периодического коагулологического контроля [1, 2, 12].

При полиглобулии, характеризующейся эритроцитозом и тромбоцитозом, проводят терапию основного заболевания. При эритремии избыток эритроцитов удаляют повторными эритроцитаферезами. Повышенную агрегационную активность тромбоцитов купируют антиагрегантами (аспирин, клопидогрел и др.), при гиперкоагуляции проводят лечение подкожными инъекциями низкомолекулярных гепаринов (эноксапарин, надропарин, делтапарин) или фондапаринукс. По показаниям (прогрессия миелопролиферативного процесса) назначают цитостатики (гидроксимочевина, интерферон α, анагрелид). В процессе эритроцитафереза пациенту внутривенно вводят нефракционированный гепарин и назначают антиагреганты (аспирин, клопидогрел или их комбинацию).

Гиперкоагуляционный синдром при опухолевом гипертромбоцитозе (хронический мегакариоцитарный лейкоз, сублейкемический миелоз, миелофиброз, остеомиелосклероз) требует проведения терапии основного заболевания. Непосредственно гипертромбоци-

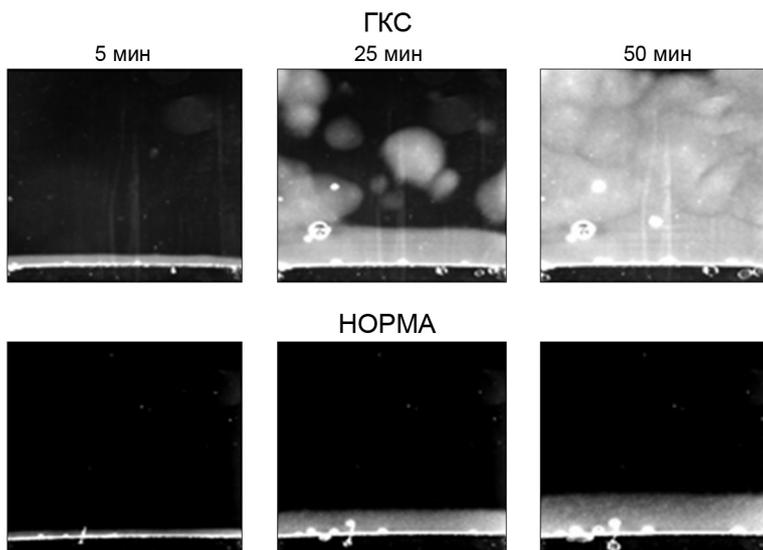


Рис. 3. Пространственный рост сгустка в норме и при ГКС.

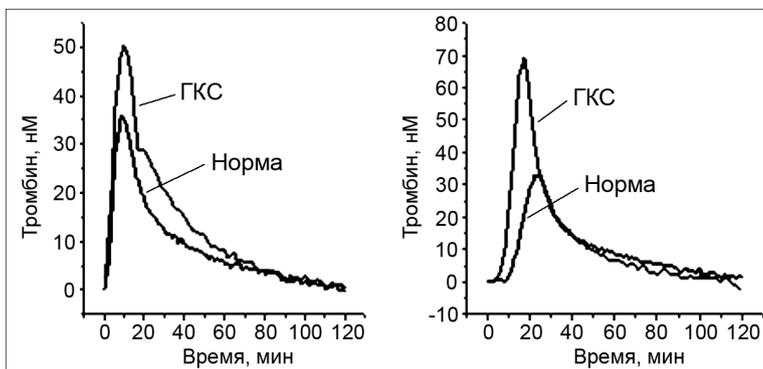


Рис. 4. Повышение тромбинового потенциала при ГКС.

тоз с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов лечат антиагрегантами (аспирин, клопидогрел, тикагрелор) и интерфероном α, гидроксимочевиной, анагрелидом. Целесообразно проводить исследование агрегационной активности тромбоцитов в динамике. Контролем адекватности проводимой антиагрегантной терапии служат снижение агрегации и дезагрегация кровяных пластинок в тестах с АДФ, арахидоновой кислотой. При выраженном гипертромбоцитозе (содержание тромбоцитов до 1000–1500 × 10⁹/л), показано проведение тромбоцитафереза с целью снижения тромбоцитов в крови в 1,5–2 раза от исходного уровня. Процедуры тромбоцитафереза целесообразно проводить повторно и последовательно, чтобы избежать рикошетного повышения концентрации тромбоцитов и,

Таблица 4

Характерные признаки гиперкоагуляционного синдрома и различных фаз ДВС-синдрома

Коагуляционные проявления	Характерные признаки
Гиперкоагуляционный синдром	Укорочение АЧТВ, протромбинового времени; повышенная активность тромбоцитов; кровь при заборе сворачивается в игле; в пробирке сгусток образуется быстро – сгусток рыхлый; фибринолиз умеренно снижен; острые тромбозы отсутствуют; гиперкоагуляция на тромбозластограмме. D-димер бывает немного повышен
Гиперкоагуляционная фаза ДВС-синдрома	Укорочение АЧТВ, протромбинового времени; гиперактивность тромбоцитов. Лабораторные признаки потребления: снижение содержания тромбоцитов, факторов свертывания, фибронектина, АТШ, протеина С и S; фибринолиз резко снижен. Кровь при заборе сворачивается в игле. Клинические признаки: тромбозы, полиорганная недостаточность. В пробирке сгусток образуется быстро, нестойкий. Гиперкоагуляция на тромбозластограмме – образование тромба с рыхлыми краями. В тесте пространственного роста сгустка – гиперкоагуляция. Резко повышен тромбиновый потенциал – гипертромбинемия. D-димер существенно повышен
Гипокоагуляционная фаза ДВС-синдрома	Клинически – резкое удлинение времени образования сгустка в пробирке, кровоточивость, полиорганная недостаточность. Лабораторно – снижение числа тромбоцитов, удлинение протромбинового времени, пониженная активность тромбоцитов, снижение концентрации факторов свертывания, фибронектина, АТШ, протеина С и S. Резкое повышение содержания ПДФ, D-димера. На ТЭГ выраженная гипокоагуляция. В тромбодинамическом тесте – резкое снижение свертываемости плазмы. Снижен тромбиновый потенциал

соответственно, локального и диссеминированного тромбообразования. Тромбоцитферез сочетают с цитостатической терапией основного заболевания (гидроксимочевина, интерферон α и др.), назначением антикоагулянтов – нефракционированного и низкомолекулярных гепаринов, антиагрегантов.

При ГКС, развивающемся в ответ на повреждение эндотелия, терапия, направленная на его коррекцию, отличается многообразием. При инфекционной эндотелиопатии (сепсисы, тяжелые пневмонии и другие инфекции) интенсивная антибактериальная терапия сопровождается непрерывным внутривенным введением (инфузоматом) нефракционированного гепарина [12, 22].

При патологии, обусловленной циркулирующей иммунных комплексов, эффективны антиагреганты, нефракционированный и низкомолекулярные гепарины. При геморрагическом васкулите Шенлейна–Геноха ГКС лечат гепарином, антиагрегантами, процедурами терапевтического плазмафереза. Плазмаферез проводят в обычном режиме или селективном (гепаринокрипреципитация, гепаринокриофракционирование). При лечении осложнений иммунокомплексных васкулитов (эрозивные поражения, трофические язвы кожи) применяют вазпростан и местно аутофибронектин. При ГКС, осложняющем течение лейкоцитокластического васкулита, используют антипротеазные препараты (апротинин), плазмаферез в сочетании с назначением сульфасалазина [4, 5, 11, 16].

При аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка, болезнь Бехчета и др.) наряду с использованием стероидных гормонов эффективна терапия гепаринами, антиагрегантами, плазмаферезом. Иногда применяют иммуносупрессивные препараты.

ГКС при атеросклеротическом повреждении сосудов (коронарных артерий) наряду с традиционной терапией ишемической болезни сердца (нитраты, β -блокаторы, антагонисты кальция и др.) требует применения антиагрегантов (аспирин, клопидогрел) и их комбинаций (аспирин + клопидогрел). Об адекватности терапии судят по отсутствию второй волны агрегации и наличию феномена дезагрегации тромбоцитов. Также могут применяться нефракционированный и низкомолекулярные гепарины. Возможно использование пероральных антикоагулянтов – варфарин, ривароксабан, апиксабан или сулодексид (комплекс глюкозаминогликанов). Лечение антиагрегантами и прямыми или непрямыми антикоагулянтами контролируют по исчезновению лабораторных признаков гиперкоагуляции и нормализации показателей фибринолиза. Необходимо добиваться нормализации концентрации D-димера в случае ее исходного повышения. Тест на продукты деградации фибриногена–фибрин (ортофенантролиновый тест) должен быть отрицательным [11]. При терапии варфарином протромбиновый индекс должен быть укорочен до 28–35%, а МНО должно быть удлинено до 2–3. У пожилых допускается удлинение МНО до 1,6–1,8 [5, 8, 18, 19].

При остром ГКС с угрозой тромбоза коронарных артерий и развития острого инфаркта миокарда применяют технологию непрерывного внутривенного введения нефракционированного гепарина, используя для этого инфузомат, назначают аспирин, большие дозы клопидогрела (однократно 300 мг, а затем 75 мг в день). При осуществлении экстренного баллонирования и стентирования коронарных артерий (в случае необходимости и определения локализации места критического сужения просвета сосуда, нуждающегося в стентировании) наряду с терапией антикоагулянтами и антиагрегантами используют препарат монафрам, представляющий собой Fab_2 -фрагменты моноклональных антител против мембранного гликопротеина IIb–IIIa тромбоцитов. Монафрам резко снижает агрегацию тромбоцитов (при исследовании агрегации тромбоцитов в ответ на АДФ записывается прямая линия, сохраняются только изменения формы тромбоцитов), предотвращает рестеноз коронарного стента и, соответственно, снижает риск развития острого инфаркта миокарда, уменьшает признаки ишемии сердечной мышцы [24, 25]. При атеросклеротическом изменении коронарных сосудов с нарушением кровотока (турбулентные потоки) проводят плановое баллонирование коронарных артерий с установкой стентов в стенозированных участках или аортокоронарное шунтирование. Медикаментозную терапию ГКС осуществляют в полном объеме (дезагреганты, различные антикоагулянты). После стентирования применяют сочетанную терапию: тромбo-асс 100 мг 1–2 раза в день + плавикс 75 мг 1 раз в день в течение 1 года. Если выявляется гипергомоцистемия, назначают на длительный срок витамины B_6 и B_{12} в сочетании с пероральным приемом фолиевой кислоты [5, 16].

Терапия ГКС при тромбофилиях отличается специфичностью и разноплановостью. При дефиците АТIII пациентам периодически вводят внутривенно очищенный препарат АТIII. В медикаментозной терапии отдается предпочтение антикоагулянтам, механизм действия которых заключается в ингибировании свертывания, минуя АТIII (ривароксабан, апиксабан, дабигатран и др.). Эффек-

тивна терапия антиагрегантами и непрямыми антикоагулянтами, в частности варфарином [5, 9, 19].

При дефиците протеина С терапию проводят низкомолекулярными гепаринами, фондапириноком, ривароксабаном, апиксабаном, дабигатраном, а также антиагрегантами (аспирин, клопидогрел, тикагрелор и др.). Положительно влияют вазопротекторы – антистакс, гесперидин с диосмином. В тяжелых случаях возможно переливание очищенного плазменного протеина С. В терапии ГКС при гетерозиготном дефиците протеина С (протеин С является витамин К-зависимой протеазой, вырабатываемой в печени) назначение непрямым антикоагулянтам (варфарина и др.) проблематично, так как эти препараты снижают активность в крови не только витамин К-зависимых факторов (ФII, ФVII, ФIX, ФX), но и содержание протеина С и протеина S, что может усугубить тромбогенность и вызвать тромбозы и варфариновые некрозы кожи.

У детей с неонатальной фульминантной пурпурой, обусловленной наследственным гомозиготным выраженным дефицитом протеина С, лечение осуществляется обязательным периодическим введением концентрата протеина С (сепротин, «Бакстер») [5, 8, 19].

Гипергомоцистемический ГКС лечат витаминами B_6 , B_{12} , фолиевой кислотой, которую назначают в дозе 5–10 мг/сут. Можно использовать специальные комплексные препараты, такие как нейромультвит, фолацин, ангиовит [5, 16].

В терапии пролонгированного и острого ГКС при антифосфолипидном синдроме предпочтение отдают аспирину или сочетанию аспирина с плавиксом. Эффективно применение варфарина и других антикоагулянтов (прадакса, ксарелто, апиксабан). В терапии пациентов с антифосфолипидным синдромом, в том числе беременных (с невынашиваемостью беременности), используют лечебный плазмаферез с удалением за процедуру от 250 до 350 мл плазмы с замещением физиологическим раствором. Курс плазмафереза обычно составляет 6–8 процедур. Критерием его эффективности считают элиминацию волчаночного антикоагулянта или существенное снижение содержания антител «волчаночного типа» (антитела к кардиолипину IgM, IgG, антитела к β_2 -гликопротеину 1). В лечении катастрофического антифосфолипидного синдрома с различной степенью эффективности используют также введение моноклональных антител против антигена CD20-лимфоцитов (ритуксимаба), стероидные гормоны, цитостатики, внутривенно иммуноглобулин, лечебные плазмаферезы, переливание СЗП. Осуществляют инструментальную и медикаментозную протекцию недостаточности жизненно важных органов [1, 5, 6, 8, 10, 11, 26].

При синдроме «липких тромбоцитов» применяют антиагреганты и их комбинации, такие как аспирин + клопидогрел, тикагрелор + аспирин и др. Лечение контролируют по феномену снижения агрегации тромбоцитов при агрегометрии. Дополнительно применяют блокатор кальциевых каналов – нифедипин.

ГКС при повышенном содержании ФVIII и фактора Виллебранда купируют низкомолекулярными гепаринами, непрямыми антикоагулянтами (варфарин, синкумар) и антиагрегантами. Возможно применение других антикоагулянтов, таких как дабигатран, ривароксабан, апиксабан. Эффективен плазмаферез с удалением умеренных (до 500 мл у взрослых) количеств плазмы [1, 11] и обязательным восполнением переливанием СЗП и/или альбумина.

ГКС вследствие контакта крови с инородными материалами (искусственные клапаны сердца, протезы сосудов) лечат различными препаратами гепарина, непрямыми антикоагулянтами (варфарин, синкумар) и антиагрегантами (аспирин, клопидогрел). При проведении гемодиализа, гемофильтрации или операций с использованием аппарата искусственного кровообращения ГКС купируют нефракционированным и низкомолекулярными гепаринами. При дефиците АТIII во время гемодиализа вводится очищенный препарат АТIII [2, 5, 22].

ГКС вследствие нарушения целостности сосудистой стенки в первую очередь требует остановки кровотечения. Эта форма ГКС легко переходит в гиперкоагуляционную фазу ДВС-синдрома, поэтому в его терапии преимущество отдают внутривенным трансфузиям СЗП в больших объемах (до 30 мл/кг массы тела).

Терапию ГКС при тромбоцитопении проводят дифференцированно, с учетом ее этиологии и глубины.

При апластической анемии наследственной и цитотоксической природы хронический ГКС, как правило, не требует коррекции. При появлении спонтанной кровоточивости или при необходимости какого-либо оперативного вмешательства наряду с трансфузиями концентратов тромбоцитов переливают СЗП.

При наследственной тромбоцитической тромбоцитопенической пурпуре (ТПП) (синдроме Мошковица) для купирования ГКС показаны периодические трансфузии СЗП и криосупернатанта как источников фермента ADAMTS 13. Аутоиммунную форму ТПП

лечат стероидными гормонами, винкристином, плазмаферезом с замещением СЗП или криосупернатантом, ритуксимабом. Применяют спленэктомии [27–29].

В настоящее время важна дифференциация тромбозов: выделение тромбозов венозной системы, тромбозов микроциркуляторного русла и артериальных тромбозов. Основу венозных тромбозов составляет фибрин. Основу же артериальных тромбозов составляет фактор Виллебранда, который совместно с тромбоцитами формирует так называемые «белые» артериальные тромбы. Лизирование венозных тромбов осуществляет система фибринолиза и его кардинальная протеаза – плазмин (образуется при активации плазминогена). Артериальные же тромбы не лизируются плазмином. Для расщепления артериальных тромбов и локализуемого в артериальных тромбах больших количеств фактора Виллебранда необходима металлопротеиназа ADAMTS 13 [30].

Универсальным препаратом для лизиса венозных и артериальных тромбов является свежемороженая плазма. СЗП содержит и компоненты системы фибринолиза и ADAMTS 13. Таким образом, СЗП способна эффективно растворять (расщеплять) и венозные, и артериальные тромбы благодаря содержащимся в ней компонентам фибринолитической системы и ADAMTS 13. Эффективность СЗП в лечении различных вариантов тромбозов (формы синдрома Мошковица, ДВС-синдром и др.) сегодня хорошо известна. В перспективе в терапии артериальных тромбозов найдет свое применение рекомбинантный препарат ADAMTS 13.

В лечении хронического ГКС при онкологической патологии используют антикоагулянты прямого и непрямого действия. Лечение носит длительный характер, предпочтение отдают низкомолекулярным гепаринам. В отдельных случаях антикоагулянты сочетают с антиагрегантами (монопрепаратами и их комбинациями). Купируют опухолевый ГКС путем эрадикации опухолевого процесса (хирургическая операция, полихимио- или лучевая терапия) в сочетании с антикоагулянтной и антиагрегантной терапией. Показаны трансфузии СЗП.

При проведении высокодозной химиотерапии злокачественных лимфопролиферативных заболеваний наряду с цитостатиками в качестве сопровождающей терапии, направленной на купирование ГКС, предпочтение отдают нефракционированному гепарину, который вводят инфузатом непрерывно. Такой подход резко снижает развитие тромботических осложнений [5, 8].

ГКС при внутрисосудистом аутоиммунном гемолизе лечат стероидными гормонами, цитостатиками. Проводят спленэктомии. Определенной эффективностью обладают дезагреганты (курантил, пентоксифиллин). Применяют также плазмаферез, поливалентный иммуноглобулин, ритуксимаб [1].

Акушерский ГКС требует лечения, когда у пациенток имеются мутации генов тромбогенности (V фактор Leiden, протромбин G20210A, МТГФР), а также при дефиците АТIII, протеинов С и S, при тромботической дисфибриногемии. Терапия обязательна в случаях диагностики у беременных первичного, вторичного или катастрофического антифосфолипидного синдрома. В терапии перечисленных состояний предпочтение отдают низкомолекулярным гепаринам, небольшим дозам аспирина, курантила. Акушерский ГКС нередко требует терапии низкомолекулярными гепаринами и антиагрегантами (аспирин, курантил) на протяжении всего периода беременности. При угрозе тромбоза низкомолекулярные гепарины вводят до 6 нед в послеродовом периоде [5, 8].

В заключение необходимо еще раз отметить необходимость радикальной терапии многочисленных причин развития ГКС, без которых зачастую невозможна оптимальная его коррекция, способная предупредить развитие осложнений, вплоть до летальных. Также необходимо постоянное диспансерное наблюдение и/или контроль лечащего врача при проведении в амбулаторных условиях терапии антикоагулянтами и дезагрегантами с периодическим выполнением соответствующих лабораторных исследований.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом Президента Российской Федерации (НШ-4838.2014.7. и НШ 96-15-98100) и грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 14-07-00904, 16-29-12998, 16-07-01140, 16-07-01047

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.И., Городецкий В.М., Васильев С.А. Гиперкоагуляционный синдром: патогенез, диагностика, лечение. *Терапевтический архив*. 2002; 7: 73–6.
2. Воробьев А.И., Городецкий В.М., Шулуто Е.М., Васильев С.А. *Острая массивная кровопотеря*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2001.
3. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Карабудагова З.К. Структура и функции тромбоцитов. *Гематология и трансфузиология*. 2010; 55(5): 4–10.

4. Калинина И.И., Гржимоловский А.В., Шавлохов В.С., Караголян С.Р., Рыжко В.В., Щербаква О.В. и др. Катастрофический антифосфолипидный синдром. *Гематология и трансфузиология*. 2008; 53(1): 38–43.
5. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Смирнов А.Н., Погорельская Е.П., Маркова М.Л. Тромбозы и тромбофилии: классификация, диагностика, лечение, профилактика. *Русский медицинский журнал*. 2013; 17: 896–901.
6. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Гемдзян Э.Г., Орел Е.Б., Швелев А.А., Марголин О.В. Опыт амбулаторного лечения больных с тромбозами и тромбофилиями. *Терапевтический архив*. 2013; 12: 47–50.
7. Васильев С.А., Виноградов В.Л. Роль наследственности в развитии тромбозов. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2007; 3: 3–14.
10. Бернакевич А.И., Васильев С.А., Ескин Н.А. Состояние системы гемостаза у пациентов, подвергающихся эндопротезированию тазобедренного сустава. *Вестник травматологии и ортопедии*. 2009; 1: 37–9.
11. Васильев С.А., Городецкий В.М., Калинин Н.Н. Плазмаферез в комплексной терапии гиперкоагуляционного синдрома при гематогенных тромбофилиях. *Терапевтический архив*. 2002; 7: 61–4.
12. Воробьев А.И., Городецкий В.М., Васильев С.А. Острая массивная кровопотеря и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. *Терапевтический архив*. 1999; 7: 5–12.
14. Ильошенко С.В., Трегубов А.А., Орел Е.Б., Рудакова В.Е., Берковский А.Л., Сергеева Е.В. и др. Рецидивирующие венозные тромбозы при первичном гиперпаратиреозе – вариант тромбофилии? (описание случая). *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2004; 4: 78.
15. Зыков В.П., Комарова И.Б., Васильев С.А., Ушакова Л.В., Чучин М.Ю., Нетесова Е.В. Протромботические нарушения у детей, перенесших ишемический инсульт. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Вып. «Инсульт»*. 2009; 109(12): 18–24.
16. Виноградов В.Л., Орел Е.Б., Васильев С.А. Гипергомоцистеинемия как фактор тромботического риска (дискуссия). *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2009; 3: 13–20.
17. Табеева Г.Р., Васильев С.А., Азимова Ю.Э. Мигрень, ассоциированная с полиморфизмом генов свертывающей системы крови. *Неврологический журнал*. 2007; 6: 25–9.
21. Васильев С.А., Воробьев А.И., Городецкий В.М. Протокол диагностики и лечения острого ДВС-синдрома. *Проблемы гематологии*. 1999; 3: 40–3.
22. Кречетова А.В., Галстян Г.М., Васильев С.А., Орел Е.Б., Сариди Э.Ю., Гемдзян Э.Г. и др. Оценка тяжести состояния больных сепсисом в динамике по соотношению фибринолитической и антикоагулянтной активности плазмы крови. *Гематология и трансфузиология*. 2009; 6: 23–8.
23. Васильев С.А., Воробьев А.И., Городецкий В.М. Терапия острого синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. *Materia Medica*. 1997; 1: 29–38.
24. Мазуров А.В., Певзнер Д.В., Власик Т.Н., Руда М.Я. Антитромбоцитарные эффекты антагониста гликопротеинов IIb/IIIa Монафрама. *Российский физиологический журнал*. 2004; 90(5): 586–99.
25. Мазуров А.В., Певзнер Д.В., Староверов И.И., Самко А.Н., Антонова О.А., Иванов В.А. и др. Результаты клинических испытаний нового антагониста гликопротеинов IIb/IIIa, Монафрама, при коронарной ангиопластике высокого риска. *Кардиология*. 2005; 45(5): 4–12.
26. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Гемдзян Э.Г. Проблема геморрагического синдрома при лечении антагонистами витамина К. *Терапевтический архив*. 2012; 7: 89–94.
27. Калинина И.И., Стахина О.В., Рыжко В.В., Цветаева Н.В., Васильев С.А., Петрова В.И. Болезнь Мошковица, хроническое рецидивирующее течение. *Терапевтический архив*. 2008; 7: 65–7.
28. Васильев С.А., Цветаева Н.В. Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура. В кн.: Воробьев А.И., ред. *Рациональная фармакотерапия заболеваний системы крови*. Руководство для практических врачей. М.: Литтерра; 2009: 485–90.
29. Воронкова Е.В., Лукина Е.А., Цветаева Н.В., Левина А.А., Сахибов Я.Д., Васильев С.А. Антифосфолипидный синдром у больного с рефрактерной тромбоцитопенической пурпурой и хроническим вирусным гепатитом (обзор литературы и описание клинического наблюдения). *Гематология и трансфузиология*. 2008; 53(4): 49–54.

См. остальные источники в References

REFERENCES

1. Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M., Vasiliev S.A. Hypercoagulable syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2002; 7: 73–6. (in Russian)
2. Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M., Shulutko E.M., Vasiliev S.A. *Acute massive blood loss*. Moscow: GEOTAR-media; 2001. (in Russian)
3. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Karabudagova Z.K. The structure and function of platelets. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2010; 55(5): 4–10. (in Russian)
4. Kalinina I.I., Grzhimolovskiy A.V., Shavlokhov V.S., Karagulyan S.R., Ryzhko V.V., Shcherbakova O.V., et al. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2008; 53(1): 38–43. (in Russian)
5. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Sмирнов А.Н., Pogorelskaya E.P. Markova M.L. Thrombosis and thrombophilia: classification, diagnosis, treatment, prevention. *Russian medical journal (Russkiy meditsinskiy zhurnal)*. 2013; 17: 896–901. (in Russian)

6. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Gemdzhyan E.G., Orel E.B., Shevelev A.A., Margolin O.V. The experience of the outpatient treatment of patients with thrombosis and thrombophilia. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2013; 12: 47–50. (in Russian)
7. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L. The role of heredity in the development of thrombosis. *Thrombosis, hemostasis and rheology. Russian journal (Tromboz, gemostaz i reologiya)*. 2007; 3: 3–14. (in Russian)
8. Buller H.R., Sohne M., Middeldorp S. Treatment of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3(8): 1554–60.
9. Wells P.S. Integrated strategies for the diagnosis of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(Suppl. 1): 41–50.
10. Bernakevich A.I., Vasiliev S.A., Eskin N.A. Hemostatic system in patients undergoing hip replacement. *Bulletin of traumatology and orthopedics. Russian Journal (Vestnik travmatologii i ortopedii)*. 2009; 1: 37–9. (in Russian)
11. Vasiliev S.A., Gorodetskiy V.M., Kalinin N.N. Plasmapheresis in the treatment of hypercoagulable syndrome in hematogenous thrombophilia. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2002; 7: 61–4. (in Russian)
12. Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M., Vasiliev S.A. Acute massive blood loss, and disseminated intravascular coagulation. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 1999; 7: 5–12. (in Russian)
13. Schellong S.M. Distal DVT: worth diagnosing? Yes. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2007; 5(Suppl. 1): 51–4.
14. Ilyushenko S.V., Tregubov A.A., Orel E.B., Rudakova V.E., Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., et al. Recurrent venous thrombosis in primary hyperparathyroidism – thrombophilia option? (description of a clinical case). *Thrombosis, hemostasis and rheology. Russian journal (Tromboz, gemostaz i reologiya)*. 2004; 4: 78. (in Russian)
15. Zykov V.P., Komarova I.B., Vasiliev S.A., Ushakova L.V., Chuchin M.Yu., Netesova E.V. Prothrombotic disorders in children with ischemic stroke. *Journal of neurology and psychiatry. S. S. Korsakov. Issue "Stroke". Russian Journal (Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova, vypusk Insult)*. 2009; 109(12): 18–24. (in Russian)
16. Vinogradov V.L., Orel E.B., Vasiliev S.A. Hyperhomocysteinemia as a factor of thrombotic risk (discussion). *Thrombosis, hemostasis and rheology. Russian journal (Tromboz, gemostaz i reologiya)*. 2009; 3: 13–20. (in Russian)
17. Tabeeva G.R., Vasiliev S.A., Azimova Yu.E. Migraine associated with polymorphism of the genes of blood coagulation system. *Neurological journal. Russian journal (Nevrologicheskiy zhurnal)*. 2007; 6: 25–9. (in Russian)
18. Colman R.W., Marder V.J., Clowes A.W., George J.N., Goldhaber S.Z., eds. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Philadelphia; 2006.
19. Khan S., Dickerman J.D. Hereditary thrombophilia. *Thromb. J.* 2006; 12(4): 15–38.
20. Lee R.I., White P.D. A clinical study of the coagulation time of blood. *Am. J. Med. Sci.* 1913; 145(4): 494–503.
21. Vasiliev S.A., Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M. Protocol of the diagnosis and treatment of acute DIC. *Problems of Hematology. Russian Journal (Problemy gematologii)*. 1999; 3: 40–3. (in Russian)
22. Krechetova A.V., Galstyan G.M., Vasiliev S.A., Orel E.B., Saridi E.Yu., Gemdzhyan E.G., et al. Assessment of severity of sepsis patients in the dynamics of the ratio of fibrinolytic and anticoagulant activity of blood plasma. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2009; 6: 23–8. (in Russian)
23. Vasiliev S.A., Vorobiev A.I., Gorodetskiy V.M. Therapy of acute disseminated intravascular coagulation. *Materia Medica. Russian Journal*. 1997; 1: 29–38. (in Russian)
24. Mazurov A.V., Pevzner D.V., Vlasik T.N., Ruda M.Ya. Antiplatelet effects of glycoprotein IIb–IIIa antagonist Monafam. *Russian physiological journal (Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal)*. 2004; 90(5): 586–99. (in Russian)
25. Mazurov A.V., Pevzner D.V., Staroverov I.I., Samko A.N., Antonova O.A., Ivanov V.A., et al. Results of clinical trials of the new antagonist of glycoprotein IIb–IIIa, Monafam at high risk coronary angioplasty. *Cardiology. Russian Journal*. 2005; 45(5): 4–12. (in Russian)
26. Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Gemdzhyan E.G. The problem of hemorrhagic syndrome in the treatment of vitamin K antagonists. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2012; 7: 89–94. (in Russian)
27. Kalinina I.I., Stakhina O.V., Ryzhko V.V., Tsvetaeva N.V., Vasiliev S.A., Petrova V.I. Moshkovits's disease, a chronic relapsing course. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2008; 7: 65–7. (in Russian)
28. Vasiliev S.A., Tsvetaeva N.V. Thrombotic thrombocytopenic purpura. In: Vorobiev A.I., ed. Rational pharmacotherapy of diseases of the blood system. Manual for practitioners. Moscow: Litterra; 2009: 485–90. (in Russian)
29. Voronkova E.V., Lukina E.A., Tsvetaeva N.V., Levina A.A., Sakhibov Ya.D., Vasiliev S.A. Antiphospholipid syndrome in a patient with refractory thrombocytopenic purpura and chronic viral hepatitis (review of the literature and description of clinical observations). *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2008; 53(4): 49–54. (in Russian)
30. Denorme F., Langhauser F., Desender L., Vandenbulcke A., Rottensteiner H., Plaimauer B., et al. ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice. *Blood*. 2016; 127(19): 2337–45. doi: 10.1182/blood-2015-08-662650.

Поступила 30.01.16

Принята к печати 17.07.16

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392-036.11-085-076.5

Савченко В.Г., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Туркина А.Г., Кузьмина Л.А.,
Сорокина Т.В., Паровичникова Е.Н.

МОДИФИКАЦИЯ СТРОМАЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗАМИ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ

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

Цель исследования – охарактеризовать культуральные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) и колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕФ), полученных из костного мозга (КМ) больных острыми лейкозами и хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания и после терапевтического воздействия.

Материал и методы. ММСК были получены из КМ 74 больных гемобластомами. Оценивали показатели времени до нулевого пассажа, кумулятивной клеточной продукции ММСК, а также концентрации КОЕФ, полученных из КМ больных гемобластомами.

Результаты. У больных острыми лейкозами показатель времени до нулевого пассажа статистически значимо повышен в дебюте заболевания, тогда как у больных ХМЛ он сохраняется повышенным и после 3 мес терапии. Показатель суммарной клеточной продукции статистически значимо снижен в группе больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) в дебюте заболевания. Концентрация КОЕФ была статистически значимо снижена в обследованных группах больных в момент диагностики заболевания.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; острый миелоидный лейкоз; острый лимфобластный лейкоз; хронический миелолейкоз; колониеобразующие единицы фибробластов.

Для цитирования: Савченко В.Г., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Туркина А.Г., Кузьмина Л.А., Сорокина Т.В., Паровичникова Е.Н. Модификация стромального микроокружения у больных лейкозами до и после терапии. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 122–126. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-122-126

Savchenko V.G., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Turkina A.G., Kuzmina L.A., Sorokina T.V., Parovichnikova E.N.

ALTERATIONS OF THE BONE MARROW STROMAL MICROENVIRONMENT IN ADULT PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA BEFORE AND AFTER TREATMENT

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

Aim of the study. To investigate two types of the bone marrow (BM) stromal precursor cells, mesenchymal stromal cells (MMSCs) and fibroblast colony-forming units (CFU-Fs), in patients with acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoblastic leukemia (ALL) and chronic myeloid leukemia (CML) before and after chemotherapy.

Material and methods. BM derived MMSCs and CFU-Fs withdrawn from 74 AML, ALL and CML patients before and after chemotherapy were studied.

Results. Concentration and culture characteristics of both types of precursors were shown to be altered in patients with acute leukemia and CML.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells; acute myeloid leukemia; acute lymphoblastic leukemia; chronic myeloid leukemia; fibroblast colony-forming units.

For citation: Savchenko V.G., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Turkina A.G., Kuzmina L.A., Sorokina T.V., Parovichnikova E.N. Alterations of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with acute leukemia before and after treatment. *Hematology and Transfusiology, Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(3): 122-126. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-122-126

Funding. Present study was supported by the Grant of the Russian Foundation of Basic Research No 12-04-00457: "The effect of leukemia cells in the human hematopoietic stromal microenvironment", supervisor: Irina Nikolaevna Shipunova.

Conflict of interest. The authors declare no hidden conflicts of interest.

Received 08 May 2016

Accepted 17 July 2016

Для осуществления нормального процесса кроветворения клетки крови погружены в микроокружение, обеспечивающее их всеми факторами, необходимыми для пролиферации, созревания и дифференцировки [1]. Гемопоз является достаточно разграниченным в пространстве процессом, при котором созревание разных типов клеток происходит в специализированных нишах. Выделяют остеобластную (эндостальную) [2] нишу, которая содержит остеобласты и стромальные клетки в непосредственном взаимодействии с костью, и сосудистую (периваскулярную) нишу, состоящую из эндотелиальных клеток в тесном взаимодействии с сосудами [3, 4].

Важнейшим элементом ниши являются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК). ММСК – стромальные предшественники с мультилинейным потенциалом дифференцировки [5, 6], способные под действием соответствующих индукторов дифференцироваться в костную, хрящевую, жировую и другие ткани [7] и обладающие широкими иммуномодулирующими свойствами [8, 9]. Другим классом стромальных предшественников являются колониобразующие единицы фибробластов (КОЕФ) [10], имеющие мезенхимную природу [11] и традиционно считающиеся более зрелым классом клеток, чем ММСК.

Костно-мозговая строма регулирует кроветворение (и локально в кроветворных нишах, и дистантно, продуцируя цитокины и ростовые факторы) как в норме, так и при различных заболеваниях кроветворной системы [4, 12]. Изменение микроокружения способствует селекции и экспансии лейкозных клеток [13–15]. Показано, что бластные клетки от больных лейкозами имели преимущество в выживаемости при их совместном культивировании со стромой по сравнению с выращиванием в одной среде [16]. Также показано, что при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) лейкозные клетки стимулировали пролиферацию остеобластов, которые существенно хуже поддерживали здоровые гемопоэтические стволовые клетки, не теряя при этом способности поддерживать лейкозные клетки.

Данные о наличии морфологических изменений в клетках в разных исследованиях расходятся. В некоторых работах по изучению особенностей стромального микроокружения при развитии гемобластозов не было выявлено различий в морфологических и культуральных характеристиках ММСК у больных лейкозами [17]. Однако

в некоторых из них было показано блокирование пролиферации стромальных предшественников по сравнению с клетками здоровых доноров при совместном культивировании их со здоровыми ММСК, наличие морфологических и функциональных различий (более низкая суммарная клеточная продукция, длительное время до достижения конfluenceности, меньшее возможное число пассажей, а также сниженная способность поддержания кроветворения) [18]. Данные по наличию изменений в способности клеток к дифференцировке также различались.

Существует небольшое количество исследований, посвященных изучению воздействия химиопрепаратов на ММСК [19, 20]. Воздействие цитостатических препаратов приводило к изменению морфологии ММСК и снижению их пролиферативной активности. Для ряда заболеваний показано, что лейкозные клетки изменяли окружающие их стромальные клетки так, что последние повышали их устойчивость к воздействию цитостатическим препаратам [21].

Существует небольшое количество исследований о состоянии КОЕФ при гемобластозах. Некоторые авторы, анализируя образцы костного мозга (КМ) до начала химиотерапии, не находили различий между КОЕФ здоровых доноров и больных [11], тогда как другие показывали снижение, вплоть до полного исчезновения, концентрации КОЕФ в КМ больных острыми лейкозами [22].

Таким образом, предыдущие исследования демонстрировали противоречивые результаты из-за небольшого числа образцов, а зачастую отсутствия образцов либо до лечения, либо в процессе терапии. В этой связи выполнение этого исследования представляется особенно актуальным.

Целью настоящего исследования явилось изучение культуральных характеристик ММСК и КОЕФ, полученных из КМ больных острыми лейкозами и ХМЛ в дебюте заболевания и после терапевтического воздействия.

Материал и методы

Работа носила проспективный клинико-лабораторный характер и выполнена в научно-клиническом отделе высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга и научно-консультативном отделении химиотерапии миелопродиферативных заболеваний ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. Лабораторная часть работы осуществлялась на базе лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. Исследование проб КМ проводили на момент диагностики заболевания и на +30-й день для больных острыми лейкозами и на +3-й месяц для больных ХМЛ. Из проб КМ выделяли ядродержащие клетки, которые культивировали в питательной среде с последующей оценкой культуральных характеристик ММСК. Одновременно клетки КМ культивировали для определения концентрации КОЕФ.

В исследование были включены 74 больных (33 мужчины и 41 женщина) в возрасте от 17 до 75 лет (медиана возраста 35 лет) с впервые выявленными гемобластозами, из них 33 больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), 21 – острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), 20 – хроническим миелолейкозом (ХМЛ). При распределении пациентов по классификации ВОЗ [23] у 19 из 33 больных ОМЛ выявлен нормальный кариотип, у 2 – транслокация t(8;21), у 1 – t(15;17), у 1 – inv(16)(p13q22), у 9 – иные мутации (трисомия 8, делеция 9, 7, t(3;5) и др.), 1 больному цитогенетическое исследование не проводили. Из 21 больного ОЛЛ у 10

Для корреспонденции

Сорокина Тамара Викторовна, врач отделения высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России», 125167, г. Москва, Россия. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

For correspondence

Sorokina Tamara V., MD, Doctor of the Department of High-Dose Chemotherapy, Depressions of Hemopoiesis, and Bone Marrow Transplantation of the National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

Information about authors

Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>; Shipunova I.N., <http://orcid.org/0000-0003-1189-0283>; Bigildeev A.E., <http://orcid.org/0000-0003-0215-9085>; Drize N.I., <http://orcid.org/0000-0002-7150-0403>; Turkina A.G., <http://orcid.org/0000-0001-9947-2371>; Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Sorokina T.V., <http://orcid.org/0000-0002-5665-7074>; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>.

Таблица 1

Клинические характеристики больных

Диагноз	Число больных	Медиана возраста, годы	Бластные клетки в КМ в дебюте заболевания, %	Статус больных к моменту исследования
ОМЛ	33	39,2	67,65 ± 3,9	26 живы 7 умерли
ОЛЛ	21	29,4	86,13 ± 1,19	19 живы 2 умерли
ХМЛ	20	44,6		20 живы

зафиксирован В-клеточный вариант заболевания, у 11 – Т-клеточный вариант ОЛЛ. Основные характеристики больных представлены в табл. 1.

Лечение больных проводили в условиях ФГБУ ГНЦ Минздрава России в соответствии с нозологической формой заболевания. Больным острым лейкозом была начата терапия в соответствии с вариантом заболевания: больным ОМЛ была начата терапия по протоколу ОМЛ 01.10 – больному с t (15; 17) по протоколу AIDA, больным ОЛЛ – по протоколу ОЛЛ-2009 [8]. Больным ХМЛ проводили терапию иматинибом, тем, кто не достиг ответа, производили смену на препараты других поколений ингибиторов тирозинкиназы (ИТК). Забор образцов осуществляли в контрольные точки путем аспирации 6 мл КМ при пункции КМ. Образцы КМ помещали в пенициллиновые флаконы с гепарином и доставляли в лабораторию.

В качестве группы контроля в работе использовали образцы КМ 83 здоровых доноров (40 мужчин и 43 женщины) в возрасте от 18 до 56 лет (медиана возраста 30,5 года). Все образцы КМ были получены во время эксфузии донорского КМ для выполнения трансплантации аллогенного костного мозга в отделении высокодозной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России после подписания донорами информированного согласия.

Для выделения ядросодержащих клеток к 6 мл КМ добавляли равный объем среды α MEM с 0,2% раствором метилцеллюлозы ("Sigma") и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. В течение инкубации большая часть эритроцитов и гранулоцитов преципитировала, а мононуклеарные клетки оставались в жидкой фазе. Затем верхнюю жидкую фазу отбирали и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1200 об/мин и 24 000 g (Beckman GPR) при температуре 4 °C. Клетки осадка ресуспендировали в среде α MEM. Клетки подсчитывали в камере Горяева при окраске генциановым фиолетовым и помещали в концентрации 3×10^6 клеток в среду для культивирования, состоящую из среды α MEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% раствора L-глутамин (ICN), 0,5% раствора пенициллина (Ферейн) на флакон для культивирования с площадью поверхности дна 25 см² (Costar), и инкубировали в условиях гипоксии с 5% CO₂ и 5% O₂ при температуре 37 °C в трехгазовом инкубаторе (Sanyo). После формирования монослоя клетки промывали версеном, 0,02% раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты в физиологическом растворе ("Sigma"), а затем обрабатывали 0,25% раствором трипсина и помещали в концентрации 4×10^3 клеток на 1 см² поверхности дна флакона (нулевой пассаж P0) с последующей их инкубацией; остаток клеток замораживали в среде с добавлением равного объема ЭТС + ДМСО (диметилсульфоксид).

Количество снятых со дна флакона клеток определяли в камере Горяева, жизнеспособность клеток определяли по отсутствию окраски трипановым синим. На 2-м пассаже (P1) после высаживания клеток из оставшихся выделяли РНК. На 3-м пассаже (P2) после снятия и подсчета отделяли 100 000 клеток для последующей оценки их способности к поддержанию кроветворения, остаток клеток замораживали.

Для культивирования КОЕф мононуклеарные клетки выделяли и подсчитывали по методу, описанному выше для ММСК. После подсчета ядерные клетки помещали в количестве от 0,5 до 1×10^6 клеток на флакон T25 в среде α MEM с 20% ЭТС, культивировали в течение 2 нед в условиях гипоксии с 5% CO₂ и 5% O₂ при температуре 37 °C в трехгазовом инкубаторе (Sanyo), а затем окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового на 20% метаноле. Окрашенные колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом.

Все значения предоставлены как средняя величина ± ошибка среднего. Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel.

Результаты

Первое исследование у всех больных проводили на момент диагностики, т.е. образцы КМ были получены в развернутой стадии заболевания. Доля бластных клеток в КМ у больных ОМЛ в момент диагностики заболевания составляла 22–86,6% (медиана 64%). После 1-го курса индукции исследование проведено у 26 больных. У больных, у которых не была достигнута ремиссия, проводили смену химиотерапии на альтернативные курсы (НАМ, малые дозы цитарабина – МДЦ, МДЦ + этопозид).

Доля бластных клеток в КМ у больных ОЛЛ в момент диагностики заболевания составляла от 68–97% (медиана 88%). После 1-го курса индукции (на +30-й день от начала терапии) исследование выполнено у 19 больных. Продолжили участие в исследовании 19 из 20 больных ХМЛ после 3 мес терапии иматинибом. Больным, у которых не был достигнут большой молекулярный ответ на терапию иматинибом, впоследствии производили смену на препараты других поколений ИТК.

Все ММСК, полученные из образцов КМ больных гемобластомами, морфологически не различались от таковых, полученных от здоровых доноров. При анализе с помощью фазового контраста все они имели типичную веретеновидную фибробластоподобную форму и демонстрировали способность к формированию колоний на пластике. Скорость и темпы роста ММСК различались в отдельных образцах, однако в подавляющем большинстве случаев удавалось добиться конfluenceнтности на нулевом пассаже (P0). В ряде случаев, если клетки формировали плотные многослойные колонии, их пассировали, не дожидаясь конfluenceнтности. Все культуры формировали конfluenceнтный монослой на последующих пассажах.

Культуральные характеристики ММСК изучали в течение 3 пассажей и сравнивали с таковыми у ММСК здоровых доноров. Оценивали время, необходимое для достижения конfluenceнтного монослоя (время до P0), и суммарное количество клеток (кумулятивная клеточная продукция) за 3 пассажа.

Время до нулевого пассажа (P0) соответствовало временному промежутку от первичной посадки клеток до момента формирования ими конfluenceнтного монослоя и последующего их пассажа. Время достижения конfluenceнтности у здоровых доноров составило $13,7 \pm 0,3$ дня. У больных ОМЛ в момент диагностики заболевания время до P0 варьировало от 12 до 24 дней (в среднем $17,6 \pm 0,6$ дня), что статистически значимо превышало таковое у доноров ($p < 0,05$). Было показано, что доля бластных клеток в КМ не коррелировала с культуральными характеристиками ММСК (табл. 2).

У больных ОМЛ после 1-го курса индукции (на 30-й день от начала терапии) время до P0 составило от 9 до 25 дней, в среднем $15,5 \pm 0,9$ дня, что статистически значимо не отличалось от группы контроля. На этом этапе 42% больных ОМЛ находились вне ремиссии заболевания, в связи с чем культуральные характеристики для больных, находящихся в ремиссии и вне ее, были изучены отдельно. Было показано, что у больных, у которых была и не была достигнута ремиссия заболевания, время до P0 после 1-го курса индукции составило от 11 до 25 ($15,8 \pm 1,5$) дней и от 9 до 21 ($15,3 \pm 1,5$) дня соответственно, что статистически значимо не отличалось от доноров.

У больных ОЛЛ в момент диагностики заболевания время до P0 варьировало от 13 до 34 дней (в среднем $19,8 \pm 1,4$ дня), что на 40% превышало таковое в группе контроля ($p < 0,05$). После 1-го курса индукции (на 30-й день от начала терапии) время до P0 составило от 10 до 25, в среднем $14,1 \pm 0,9$ дня, что статистически значимо не различалось с группой здоровых доноров.

У больных ХМЛ в момент диагностики заболевания время до P0 у больных ХМЛ варьировало от 14 до 28 дней (в среднем $17,7 \pm 0,8$ дней), что на 30% превышало таковое в группе контроля ($p < 0,05$). После 3 мес от начала терапии ИТК значение этого показателя варьировало от 12 до 28 дней (в среднем $16,7 \pm 0,8$ дня), что на 20% превышало таковое у доноров ($p < 0,05$).

Показатель суммарной клеточной продукции отражает общее количество клеток, собранных за три пассажа. Только у больных ОМЛ показатель суммарной клеточной продукции был статистически

значимо ниже, чем в группе доноров, составляя $4,8 \pm 0,7 \times 10^6$ клеток (от 0 до 15×10^6 клеток). После 1-го курса индукции он варьировал от 0 до 36×10^6 клеток (в среднем $7,9 \pm 1,4 \times 10^6$ клеток), не отличаясь от группы доноров. При отдельной оценке групп больных, достигших и не достигших к моменту исследования (после 1-го курса индукции) ремиссии заболевания, не найдено статистически значимых различий: у больных в ремиссии показатель составил от 0 до $10,6 \times 10^6$ клеток, в среднем $5,7 \pm 1 \times 10^6$ клеток; у больных вне ремиссии – от 0,5 до 36×10^6 клеток, в среднем $10,5 \pm 3,4 \times 10^6$ клеток.

Значения времени до нулевого пассажа ММСК у больных острым лейкозом в зависимости от доли бластных клеток в КМ

Показатель времени до P0	Бластные клетки в КМ, %						
	20–40	41–60	61–75	76–100	76–85	86–95	96–100
У больных ОМЛ, дни	18,3 ± 1,4	20 ± 1,1	17,1 ± 1,1	16,1 ± 1,0			
У больных ОЛЛ, дни	–	–	–	20,3 ± 2,3	19,3 ± 2,8	20,3 ± 2,6	

Таблица 2

У больных ОЛЛ данный показатель статистически значимо не отличался от группы доноров (от 0 до $17,3 \times 10^6$ клеток, в среднем $5,2 \pm 1,4 \times 10^6$ клеток). После 1-го курса индукции у больных, достигших ремиссии заболевания, показатель суммарной клеточной продукции варьировался от 0 до $23,17 \times 10^6$ клеток, в среднем $8,5 \pm 2 \times 10^6$ клеток, статистически значимо не различаясь от такового в группе доноров. На этой точке ремиссия не достигнута только у 3 больных, но анализировать такую немногочисленную группу с использованием *t*-критерия Стьюдента не представляется возможным. Поэтому для анализа различий в этих группах применяли 95% доверительный интервал (ДИ), построенный для значений в группе больных в ремиссии.

Значения суммарной клеточной продукции у 2 из 3 больных, находившихся на этом этапе вне ремиссии, выходили за пределы 95% ДИ ($0,5$ и $0,9 \times 10^6$ клеток при границах ДИ от $7,4$ до $9,6 \times 10^6$ клеток). Значительно хуже росли ММСК больных, страдающих пре-В-вариантом ОЛЛ (суммарная клеточная продукция в дебюте заболевания у данной группы больных составила $3,4 \pm 2,3 \times 10^6$ клеток, после 1-го курса индукции – $4,8 \pm 2,8 \times 10^6$ клеток, однако эти различия не были статистически значимыми). У больных ХМЛ показатели суммарной клеточной продукции также статистически значимо не различались от таковых в группе доноров, варьируя в дебюте заболевания от 0 до 30 (в среднем $7,5 \pm 1,6 \times 10^6$ клеток, после 3 мес терапии ИТК – от $0,7$ до $16,9 \times 10^6$ клеток (в среднем $7,1 \pm 1,1 \times 10^6$ клеток). Концентрация КОЕф отражается в количестве колоний клеток КОЕф, выросших за 2 недели. Было показано, что они также повреждаются у больных гематологическими заболеваниями. Концентрация их в КМ больных гемобластомами статистически значимо снижена по сравнению с таковой у доноров. Концентрация КОЕф в КМ больных ОМЛ в дебюте заболевания составила от 0 до 133 (в среднем $11,5 \pm 4,6 \times 10^6$ клеток КМ, что оказалось на 50% ниже таковой у доноров ($p = 0,02$). Показатели после 1-го курса индукции от 0 до 75×10^6 клеток КМ (в среднем $27,7 \pm 4,4 \times 10^6$ клеток КМ) статистически значимо не различались от группы здоровых доноров. У больных ОЛЛ показатель концентрации КОЕф статистически значимо различался от показателя группы здоровых доноров также только в дебюте заболевания, будучи ниже его и составляя от 0 до 60 (в среднем $8,3 \pm 3,6 \times 10^6$ клеток КМ ($p = 0,001$). Показатели после 1-го курса индукции (от 0 до 140, в среднем $30,3 \pm 8,2 \times 10^6$ клеток КМ) статистически значимо не отличались от группы здоровых доноров. У больных ХМЛ на момент диагностики заболевания концентрация КОЕф составляла от 0 до 65 (в среднем $15,8 \pm 4,2 \times 10^6$ клеток КМ что оказалось на 40% ниже таковой у доноров ($p = 0,07$). Значение этого показателя после 3 мес терапии ИТК статистически значимо не отличалось от группы доноров – от 0 до 68×10^6 клеток КМ, в среднем $21,2 \pm 4,4 \times 10^6$ клеток КМ.

Обсуждение

В ходе исследования нами были получены культуры ММСК из образцов КМ, взятых до и после лечения у больных онкогематологическими заболеваниями. Морфологически они не отличались от таковых, полученных от здоровых доноров. При оценке культуральных характеристик были выявлены некоторые различия.

Так как показателем времени до нулевого пассажа косвенно свидетельствует о числе предшественников стромальных клеток в КМ, представляется вероятным, что на момент диагностики у больных острыми лейкозами статистически значимое его удлинение свидетельствует об уменьшении количества ММСК в связи с тотальной опухолевой пролиферацией и экспансией бластных клеток, подавляющих нормальное кроветворение. После проведенной терапии количество предшественников восстанавливается до нормальных значений, что связано с эффективностью химиотерапии и уменьшением числа бластных клеток в КМ. Статистически значимое удлинение времени до нулевого пассажа на контрольных точках в сроки после курса консолидации ремиссии и перед поддерживающей терапией, вероятно, обусловлено воздействием цитостатических препаратов. В группе больных ХМЛ статистически значимое удлинение этого показателя на всех точках отражает длительную персистенцию заболевания и опухолевого клона под постоянным терапевтическим воздействием. Показатель суммарной клеточной продукции отражает общее количество клеток, выросших за 3 пассажа. Он был статистически значимо снижен в дебюте заболевания в группе больных ОМЛ, отражая нарушение пролиферативных способностей ММСК у этих больных на момент диагностики заболевания. Концентрация КОЕф в группе больных острыми лейкозами статистически значимо отличалась от таковой у здоровых доноров только в момент диагностики заболевания. Тогда как при ХМЛ концентрация предшественников фибробластов уменьшалась в ходе лечения, отражая прогрессирующее поражение стромы на фоне замедленной по сравнению с острыми лейкозами элиминацией опухолевого клона.

Таким образом, наше исследование демонстрирует, что ММСК больных ОМЛ, ОЛЛ и ХМЛ морфологически не отличаются от таковых, полученных от здоровых доноров. Однако выявленные функциональные различия являются весьма значимыми. У больных острыми лейкозами показатель времени до нулевого пассажа статистически значимо выше по сравнению с группой здоровых доноров в дебюте заболевания ($17,6 \pm 0,6$ дня для больных ОМЛ, $19,8 \pm 1,4$ дней для больных ОЛЛ; $p < 0,05$). В группе больных ХМЛ значение этого показателя достоверно удлинено по сравнению с группой здоровых доноров как в дебюте заболевания ($17,7 \pm 0,8$ дней; $p < 0,05$), так и после 3 мес терапии ($16,7 \pm 0,8$ дней; $p < 0,05$). Показатель суммарной клеточной продукции в группе больных острым миелобластным лейкозом в дебюте заболевания статистически значимо снижен по сравнению с группой здоровых доноров ($4,8 \pm 0,7 \times 10^6$ клеток; $p < 0,05$). Концентрация КОЕф в группах больных острыми лейкозами и ХМЛ статистически значимо снижена по сравнению с группой здоровых доноров в момент диагностики заболевания: $11,5 \pm 4,6 \times 10^6$ клеток КМ для больных ОМЛ, $8,3 \pm 3,6 \times 10^6$ клеток КМ для больных ОЛЛ, $15,8 \pm 4,2 \times 10^6$ клеток КМ для больных ХМЛ; $p < 0,05$.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-00457 «Влияние лейкозных клеток на кроветворное стромальное микроокружение человека», руководитель Шипунова Ирина Николаевна.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003; 425(6960): 841–6.
- Nilsson S.K., Johnston H.M., Coverdale J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001; 97(8): 2293–9.
- Morrison S.J., Spradling A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; 132(4): 598–611.
- Lane S.W., Scadden D.T., Gilliland D.G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009; 114(6): 1150–7.
- Sacchetti B., Furnari A., Michienzi S., Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131(2): 324–36.
- Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3(4): 393–403.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143–7.
- Frenette P.S., Pinho S., Lucas D., Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu. Rev. Immunol*. 2013; 31: 285–316. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095919.
- Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; 466(7308): 829–34.
- Friedenstein A.J. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol*. 1976; 47: 327–59.
- Castro-Malaspina H., Gay R.E., Resnick G., Kapoor N., Meyers P., Chiarieri D., et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980; 56(2): 289–301.
- Konopleva M.Y., Jordan C.T. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J. Clin. Oncol*. 2011; 29(5): 591–9.
- Boyerinas B., Zafrir M., Yesilkalan A.E., Price T.T., Hyjek E.M., Sipkins D.A. Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. *Blood*. 2013; 121(24): 4821–31.
- Ben-Batalla I., Schulte A., Wroblewski M., Erdmann R., Heuser M., Waizenegger J.S., et al. Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood*. 2013; 122(14): 2443–52.
- Batula V.L., Chen Y., Cabreira Mda G., Ruvolo V., Wang Z., Ma W., et al. Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood*. 2013; 122(3): 357–66. doi: 10.1182/blood-2012-06-437988.
- Ito S., Barrett A.J., Dutra A., Pak E., Miner S., Keyvanfar K., et al. Long term maintenance of myeloid leukemia stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res*. 2015; 14(1): 95–104. doi: 10.1016/j.scr.2014.11.007.
- Chandran P., Le Y., Li Y., Sabloff M., Mehic J., Rosu-Myles M., Allan D.S. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. *Leuk. Res*. 2015; 39(4): 486–93. doi: 10.1016/j.leukres.2015.01.013.
- Geyh S., Rodriguez-Paredes M., Jager P., Khandanpour C., Cadeddu R.P., Gutekunst J., et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016; 30(3): 683–91. doi: 10.1038/leu.2015.325.

19. Prata Kde L., Orellana M.D., De Santis G.C., Kashima S., Fontes A.M., Carrara Rde C., et al. Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients. *Exp. Hematol.* 2010; 38(4): 292–300.e4. doi: 10.1016/j.exphem.2010.01.006.
20. Nifontova I., Svinareva D., Petrova T., Drize N. Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases. *Acta Haematol.* 2008; 119(2): 98–103.
21. Kurtova A.V., Balakrishnan K., Chen R., Ding W., Schnabl S., Quiroga M.P., et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood.* 2009; 114(20): 4441–50.
22. Nagao T., Hugo C.M. Characteristics and functions of fibroblast colony forming cells in human bone marrow. *Rinsho Ketsueki. Japanese J. Clin. Hematol.* 1983; 24(11): 1455–63.
23. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., et al. The 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016; 127(20): 2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.

Поступила 08.05.16
Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.392-036.11-085-018.46:575.08

Сорокина Т.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ В ПРОЦЕССЕ ТЕРАПИИ

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

Цель исследования – охарактеризовать уровень экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (ММСК), полученных из костного мозга больных острым лейкозом в дебюте заболевания и на фоне проводимого цитостатического воздействия.

Материал и методы. ММСК были получены из КМ 54 больных ОЛ. Из клеток была выделена РНК и построена кДНК. Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Продемонстрировано повышение в дебюте заболевания уровней экспрессии генов, продукты которых способствуют пролиферации и миграции лейкозных клеток (*IL-6, IL-8, IL-1b, CSF, JAG1, ICAM, VCAM*). В ходе терапии они снижались, но повышалась экспрессия генов, продукты которых отвечают за пролиферацию и дифференцировку ММСК (*IL-1R1, PDGERa, IGF, FGFR1, FGFR2, BGLAP*). У больных вне ремиссии заболевания ингибирование стромы глубже.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; острый миелоидный лейкоз; острый лимфобластный лейкоз.

Для цитирования: Сорокина Т.В., Шипунова И.Н., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Изменение уровней экспрессии генов в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках, полученных из костного мозга больных острыми лейкозами в процессе терапии. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(3): 126-133. DOI: 10.18821/0234-5730/2016-61-3-126-133

Sorokina T.V., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

MODIFICATION OF GENE EXPRESSION IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF THE ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS DURING CHEMOTHERAPY

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

Aim of the study. To investigate the relevant expression level in multipotent mesenchymal stromal cells (MMCs) derived from the bone marrow (BM) of acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients before and over the course of chemotherapy.

Material and Methods. BM derived MMSCs from 33 AML patients and 21 ALL patients were studied before and during chemotherapy. Total RNA was extracted from the MMSCs and the cDNA was synthesized. Gene expression levels were quantified by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with the use of gene-specific primers.

Results. Before chemotherapy, the analysis of the gene expression of MMSCs from acute leukemia patients revealed a significant increase in the relative expression level (REL) of genes (*IL-6, IL-8, IL-1b, CSF, JAG1, ICAM, VCAM*) which regulate leukemic cell proliferation and migration. The REL of genes regulating MMSC proliferation and differentiation (*IL-1R1, PDGERa, IGF, FGFR1, FGFR2, BGLAP*) increased during chemotherapy. The alterations of bone marrow stroma were more pronounced in patients who didn't achieve remission.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells; acute myeloid leukemia; acute lymphoblastic leukemia.

For citation: Sorokina T.V., Shipunova I.N., Bigildeev A.E., Drize N.I., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Modification of gene expression in mesenchymal stromal cells of the acute myeloid leukemia patients during chemotherapy. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya).* 2016; 61(3): 126-133. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730/2016-61-3-126-133

Funding. Present study was supported by the Grant of the Russian Foundation of Basic Research No 12-04-00457: "The effect of leukemia cells in the human hematopoietic stromal microenvironment", supervisor: Irina Nikolaevna Shipunova.

Conflict of interest. The authors declare no hidden conflicts of interest.

Received 08 May 2016
Accepted 17 July 2016

Для корреспонденции:

Сорокина Тамара Викторовна, врач отделения высокодозной химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. 125167, г. Москва, Россия. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

For correspondence:

Sorokina Tamara V., MD, Doctor of the Department of High-Dose Chemotherapy, Depressions of Hemopoiesis, and Bone Marrow Transplantation of the National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: tamarasorokina0@yandex.ru.

Information about authors:

Sorokina T.V., <http://orcid.org/0000-0002-5665-7074>; Shipunova I.N., <http://orcid.org/0000-0003-1189-0283>; Bigildeev A.E., <http://orcid.org/0000-0003-0215-9085>; Drize N.I., <http://orcid.org/0000-0002-7150-0403>; Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

Большинство клеток стромы костного мозга (КМ) происходят от мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). Эти клетки являются важнейшим компонентом костно-мозговой ниши и обеспечивают жизнедеятельность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [1, 2]. Регуляторная активность ММСК направлена на большое количество эффекторных клеток, таких как клетки врожденного и приобретенного иммунитета, включая Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, дендритные клетки и нейтрофилы [3]. Все исследования указывают на исключительную роль ММСК в процессах поддержания как нормального, так и патологического кроветворения. Показано наличие физических контактов между остеобластами и ГСК через молекулы адгезии, включая каттерины и интегрины [4, 5]. После их связывания происходит активация сигнальных путей, что приводит к запуску механизмов пролиферации, адгезии и миграции [6]. Однако не только прямые межклеточные взаимодействия с клетками стромы опосредует выживаемость лейкозных клеток, но и выделяемые ММСК факторы роста, цитокины и хемокины [6]. В ряде экспериментов предпринимались попытки выращивания линий человеческих бластных клеток от больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) с использованием линий стромальных клеток и ростовых факторов, и было выдвинуто предположение, что ММСК обеспечивают преимущество в выживании лейкозных стволовых клеток (ЛСК) и могут использоваться в культурах ЛСК даже без добавления ростовых факторов [7, 8].

Факторы роста могут также способствовать выживаемости бластных клеток в КМ. Концентрация фактора роста эндотелия сосудов VEGF [9] может играть прогностическую роль при развитии ОМЛ [10], а повышение концентрации ангиопоэтина-2 коррелирует с плохим ответом на терапию [11]. В ряде исследований показаны проонкогенные эффекты $TGF\beta 1$, стимулирующего пролиферацию клеток ОМЛ. У больных острыми лейкозами продемонстрировано повышение концентрации FGF [12], а также IGF1 и SDF1 [13] по сравнению с группой контроля, состоящей из здоровых доноров.

Лейкозные клетки могут использовать механизмы регуляции роста и развития ГСК. Эксперименты на мышах показали, что как нормальные, так и ЛСК предпочтительно локализируются в нишах, богатых SDF1. Однако, когда они трансплантировались одновременно, ЛСК «выигрывали» у ГСК в конкуренции за локализацию в нише [14], из-за чего последние были вынуждены размещаться в менее предпочтительных нишах КМ. Данные этого исследования показали, что наличие лейкозных клеток разрывает нормальные пути межклеточной передачи сигнала, приводя к необратимым изменениям здоровых гемопоэтических предшественников [14].

Предполагают, что отличия ММСК больных лейкозами от ММСК доноров можно объяснить как селекцией злокачественными клетками той субпопуляции ММСК *in vivo*, что будет способствовать росту лейкозных клеток, так и генетическими аномалиями, возникающими в самих ММСК [15]. Профиль экспрессии генов в ММСК больных МДС и ОМЛ отличается от аналогичных показателей у здоровых доноров [16]. В большинстве работ описано снижение уровня экспрессии стромального фактора *SDF1* в ММСК больных острыми лейкозами, повышение экспрессии *TGF\beta 1* и *HGF* в дебюте заболевания, а также уровня *BMP4* в ходе терапии. Данные многочисленных исследований [14, 17, 18] продемонстрировали, что снижение экспрессии гена остеокальцина (*BGLAP*), наблюдаемое в ММСК больных лейкозами, приводит к угнетению остеогенеза, уменьшению числа остеобластов и снижению объема костной ткани. В ММСК больных лейкозами было выявлено повышение уровня экспрессии гена *IL-6*, продукт которого способен подавлять цитотоксичность NK-клеток в отношении бластных клеток, а также повышение уровня экспрессии *JAG1* [19], *ANG1* и *SPP1* [20] в ММСК больных ОМЛ. Их увеличенная экспрессия может стимулировать переход лейкозных клеток в состояние покоя, обуславливая развитие резистентности к проводимой химиотерапии и возникновение последующих рецидивов [21].

Все различия в экспрессии генов в ММСК являются скорее следствием, нежели причиной заболевания, что подтверждается восстановлением их уровней в случае достижения полной ремиссии при проводимой химиотерапии [22]. Изучение эффектов цитостатических препаратов на состояние микроокружения осложняется тем, что в большинстве случаев используются их сочетания для усиления оказываемого эффекта. Многие химиопрепараты изменяют способность ГСК к «хоумингу» путем нарушения эндотелиального барьера и увеличения секреции цитокинов и хемокинов, влияющих на миграцию и репопуляцию ГСК. Стромальные клетки защищают лейкозные клетки от влияния цитостатических препаратов [23]. Показан защитный механизм ММСК от воздействия L-аспарагиназы: при совместном культивировании клеток острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) с клетками стромы последние защищали клетки ОЛЛ от аспарагиназы-

обусловленного апоптоза путем избыточной экспрессии аспарагин-синтетазы. Эти эксперименты указывают на важнейшую роль микроокружения в развитии гемобластозов, однако как именно ММСК регулируют процесс лейкогенеза, до сих пор остается неясным [24–27].

Цель исследования – характеристика уровней экспрессии генов в ММСК, полученных из костного мозга больных острыми лейкозами в дебюте заболевания и на фоне проводимого цитостатического воздействия.

Материал и методы

Работа носила проспективный клинико-лабораторный характер. В исследование были включены 54 больных (22 мужчины и 32 женщины) в возрасте от 17 до 75 лет (медиана возраста 35 лет) с впервые выявленными гемобластомами, из них 33 больных ОМЛ, 21 – ОЛЛ. Всех больных наблюдали в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России с мая 2013 по февраль 2016 г. Исследование проб КМ проводили на момент диагностики заболевания, на +30-й день, +100-й день, +180-й день терапии. Из проб КМ выделяли ядродержащие клетки, которые затем культивировали в питательной среде. Из клеток первого пассажа выделяли РНК и оценивали уровень экспрессии 22 генов (*IL-6*, *IL-8*, *IL-1b*, *IL-1\beta*, *JAG1*, *SPP1*, *BGLAP*, *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *TGF\beta 1*, *TGF\beta 2*, *SDF1*, *VEGF*, *IGF*, *CSF*, *ANG1*, *VCAM*, *ICAM*, *SOX9*, *LIF*, *PPARG*) методом полимеразной цепной реакции с предшествующей обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

В качестве контроля в работе были использованы образцы костного мозга 95 здоровых доноров, 46 мужчин и 49 женщин в возрасте от 13 лет до 61 года (медиана возраста 33 года). Все образцы получены во время эксфузии КМ в отделении трансплантации костного мозга.

Для получения культуры ММСК сначала выделяли ядродержащие клетки в градиенте плотности метилцеллюлозы. Клетки ресуспендировали в среде α MEM, подсчитывали в камере Горяева при окраске генциановым фиолетовым и помещали во флаконы для культивирования в концентрации 3×10^6 клеток в среду с содержанием 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). При пассажах клетки отделяли от пластики раствором трипсина, подсчитывали и рассаживали в концентрации 1×10^5 клеток с их инкубацией. На первом пассаже после высаживания клеток из оставшихся выделяли РНК.

Для выделения РНК из клеток их промывали ЭДТА, добавляли денатурирующий раствор и замораживали. В дальнейшем к пробам добавляли 2 М NaAc и перемешивали, затем в каждую пробирку добавляли последовательно кислый фенол, хлороформ и центрифугировали на скорости 10 000 об/мин при температуре 4 °C в течение 20 мин. Верхнюю фазу переносили в RNA-free пробирки, добавляли равный объем изопропанола и оставляли при температуре -20 °C.

Для построения комплементарной ДНК (кДНК) РНК осаждали, промывали этанолом и растворяли в 100 мкл воды. После этого к РНК добавляли смесь T13-праймеров и инкубировали в амплификаторе. Затем проводили ревертазную реакцию, для чего добавляли буфер для ревертазы, дНТФ, Рназин, ревертазу и воду. После инкубации добавляли 75 мкл воды и использовали в качестве раствора к ДНК соответствующего образца.

В ММСК оценивали уровень экспрессии генов, отвечающих за:

- способность к самоподдержанию (*FGFR1*, *FGFR2*);
- пролиферацию (*FGF2*);
- морфогенез (*BMP4*, *SOX9*, *SPP1*, *BGLAP*, *PPARG*, *VEGF*);
- регуляцию кроветворения (*JAG1*, *TGF\beta 2*, *TGF\beta 1*, *CSF*, *ANG1*);
- иммунный ответ (*IL-1\beta*, *IL-1R*, *IL-6*, *IL-8*).

В качестве контроля во всех проводимых исследованиях использовали данные, полученные по группе здоровых доноров.

Наличие интересующего гена определяли с помощью специфических праймеров и зондов. В качестве красителя использовали карбокси-Х-родамин (ROX) для генов «домашнего хозяйства» и карбоксифлюоресцеин (FAM) для исследуемых генов. В качестве газетель флюоресценции для флюорофора ROX использовали RTQ2, для флюорофора FAM – RTQ1. Все ПЦР проводили на приборе StepOnePlus (Life technologies). Для каждого образца выполняли по 3 пробы. После определения Ct вычисляли среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации.

Для статистического анализа сравниваемые группы больных и здоровых доноров были сбалансированы по основным демографическим показателям (полу и возрасту) и значимым клиническим признакам. Ввиду того, что распределение в исследуемых выборках не является нормальным, а в большей части случаев относится к лог-нормальному, при анализе мы использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [28].

Результаты обработаны с помощью программы Statistical Analysis System (SAS 9.3). Графическое пояснение представлено в виде диаграмм разброса (боксы-плоты) данных логарифмов значений с минимумом и максимумом для каждого значения, 1–3-м квартилями (Q_{25} – Q_{75}), значениями среднего и медианы.

Таблица 1

Число больных, обследованных на разных этапах

Больные	0 точка	1-я точка	2-я точка	3-я точка
ОМЛ	33	26 (78,8%)	25 (76%)	24 (73%)
ОЛЛ	21	19 (90%)	19 (90%)	19 (90%)

Таблица 2

Относительный уровень экспрессии генов, изучавшихся в работе, у больных гемобластозами на разных точках

Ген	Относительный уровень экспрессии генов							
	ОМЛ	ОЛЛ	ОМЛ	ОЛЛ	ОМЛ	ОЛЛ	ОМЛ	ОЛЛ
	дебют заболевания		+30 дней терапии		+100 дней терапии		+180 дней терапии	
<i>IL-6</i>	83,95	193,19	99,83**	101,09**	108,92**	92,91**	50,86**	80,50**
<i>IL-8</i>	8,01	6,25	6,55	3,40*	2,24**	1,67**	1,78**	4,69
<i>IL-1β</i>	27,09	3,98	8,66	3,88	6,55	4,42	2,97	17,70*
<i>IL-1R1</i>	3,10*	3,73	1,04*	1,37**	1,00*	1,66	0,58**	1,84
<i>CSF</i>	3,57**	2,56**	0,96	0,53	0,55	0,74	0,31	0,52
<i>FGF2</i>	3,86*	4,00	3,32**	2,00**	2,96**	2,71**	1,78**	6,18
<i>FGFR1</i>	0,96**	0,71	0,21**	0,23**	0,22**	0,28**	0,15**	0,33**
<i>FGFR2</i>	1,59	1,21	0,27**	0,32**	0,31**	0,48**	0,19**	0,39**
<i>VEGF</i>	1,49**	1,19**	0,31**	0,14**	0,13**	0,13**	0,07**	0,26**
<i>VCAM</i>	2,36	5,18	1,35	0,66**	0,74**	0,94**	0,56**	0,87**
<i>JAG1</i>	5,33**	3,69**	1,86	1,06**	0,95**	1,96	0,79**	1,06**
<i>Sdf1</i>	1,06	1,09	0,18**	0,08**	0,06**	0,09**	0,04**	0,06**
<i>BGLAP</i>	0,65**	2,98	1,55	1,92	1,52	2,99	1,48	1,87
<i>SPP1</i>	0,65	0,17*	0,11**	0,03**	0,05	0,08*	0,06*	0,09
<i>SOX9</i>	1,14**	0,98**	0,16**	0,22**	0,29**	0,24**	0,14**	0,15**
<i>PPARG</i>	1,45**	1,26	0,39	0,41	0,52	0,42	0,82	0,47
<i>TGFβ1</i>	1,10	0,80	0,23**	0,09**	0,12**	0,13**	0,07**	0,13**
<i>TGFβ2</i>	4,37	2,35**	1,41**	0,65**	1,38**	0,46**	0,99**	1,88**
<i>IGF1</i>	1,22*	1,20	1,54	0,58	0,33*	0,35	0,21**	0,47*
<i>ICAM1</i>	0,55	0,19**	0,08**	0,06**	0,05**	0,04**	0,03**	0,04**
<i>LIF</i>	9,06**	8,64**	2,68	3,59	2,62	5,07**	2,57	3,98

Примечание. Статистически значимые различия с донорами: * – 0,05 < p < 0,1; ** – p < 0,05.

Результаты

Нулевая точка исследования для всех пациентов приходится на момент диагностики, то есть образцы КМ были получены в развернутой стадии заболевания. После 1-го курса индукции в живых остались 26 (78,8%) из 33 больных (табл. 1). К моменту 2-й точки (+100 дней от начала терапии) в живых остались 25 (76%) больных, из них ремиссия была достигнута у 22 человек. У больных, не достигших ремиссии, проводили смену химиотерапии на альтернативные курсы (НАМ, малые дозы цитарабина – МДЦ). К моменту 3-й точки (+180 дней от начала терапии) в живых остались 24 (73%) больных, из них ремиссия была у 20 человек.

К 1-й точке (+30 дней от начала терапии) в живых остались 19 (90%) из 21 больных ОЛЛ, из них у 16 была достигнута ремиссия. К моменту 2-й точки (+100 дней от начала терапии) ремиссия была достигнута у 18 из 19 больных. К моменту 3-й точки

(+180 дней от начала терапии) все 19 больных находились в ремиссии.

Результаты анализа генов представлены в зависимости от функции продуктов их экспрессии (табл. 2).

Экспрессия генов, ответственных за поддержание иммунного ответа

В дебюте заболевания во всех группах отмечалось почти десятикратное повышение экспрессии гена *IL-6*, уровни которого оставались повышенными и далее в ходе терапии. Также в момент диагностики у больных острыми лейкозами было продемонстрировано повышение уровня экспрессии гена *IL-8*, который в дальнейшем снижался (рис. 1). У больных ОМЛ его уровень снижался с 8 ± 3 в дебюте заболевания до $1,8 \pm 0,9$ к моменту исследования перед поддерживающей терапией (p < 0,05). На нулевой точке отмечалось повышение экспрессии гена *IL-1β1*, а также гена его рецептора – *IL-1R1* (рис. 2).

Экспрессия генов, ответственных за регуляцию кроветворения

На нулевой точке также показана повышенная экспрессия гена колониестимулирующего фактора (КСФ), которая нормализовалась в ходе терапии (рис. 3). У больных ОМЛ уровень его экспрессии на момент диагностики снижался с $3,6 \pm 0,77$ заболевания до $0,3 \pm 0,03$ перед началом поддерживающей терапии (p < 0,05).

В дебюте заболевания была продемонстрирована повышенная экспрессия гена *JAG1* ($5,3 \pm 0,53$ у больных ОМЛ, $3,7 \pm 0,6$ у больных ОЛЛ; p < 0,05), уровень которой снижался в ходе терапии (до $0,8 \pm 0,1$ у больных ОМЛ, $1,06 \pm 0,12$ у больных ОЛЛ к моменту перед началом поддерживающей терапии; p < 0,05) (рис. 4). У больных ОМЛ уровень его экспрессии снижался с более чем 300% до 50% от нормы.

В процессе терапии показано снижение повышенной экспрессии гена *SPP1*, однако различия не были статистически значимыми.

В дебюте заболевания в группе больных острыми лейкозами наблюдался нормальный уровень экспрессии гена *SDF1*, который далее снижался. У больных ОМЛ перед началом поддерживающей терапии его экспрессия выявлена на уровне $0,04 \pm 0,004$, а у больных ОЛЛ – $0,06 \pm 0,01$ (p < 0,05), что составило 4 и 6% от группы здоровых доноров соответственно.

Показана повышенная экспрессия гена *LIF* ($9,1 \pm 1,2$ у больных ОМЛ и $8,6 \pm 1,6$ у больных ОЛЛ, p < 0,05), что превышало показатель у здоровых доноров более чем в 4 раза. Уровень его экспрессии снижался в ходе терапии (рис. 5).

На протяжении цитостатического воздействия отмечалось снижение уровней экспрессии генов семейства *TGFβ* (рис. 6). У больных ОМЛ уже к моменту исследования после 1-го курса индукции уровень экспрессии гена *TGFβ1* составлял $0,2 \pm 0,04$, что соответствовало 20% от уровня аналогичного показателя у здоровых доноров, хотя на момент диагностики заболевания уровень его экспрессии превышал таковой у доноров. На последующих точках уровень экспрессии продолжал снижаться до $0,1 \pm 0,01$ у больных ОМЛ и $0,13 \pm 0,02$ у больных ОЛЛ. Аналогичная ситуация наблюдалась и при изучении динамики изменения уровня экспрессии гена *TGFβ2*.

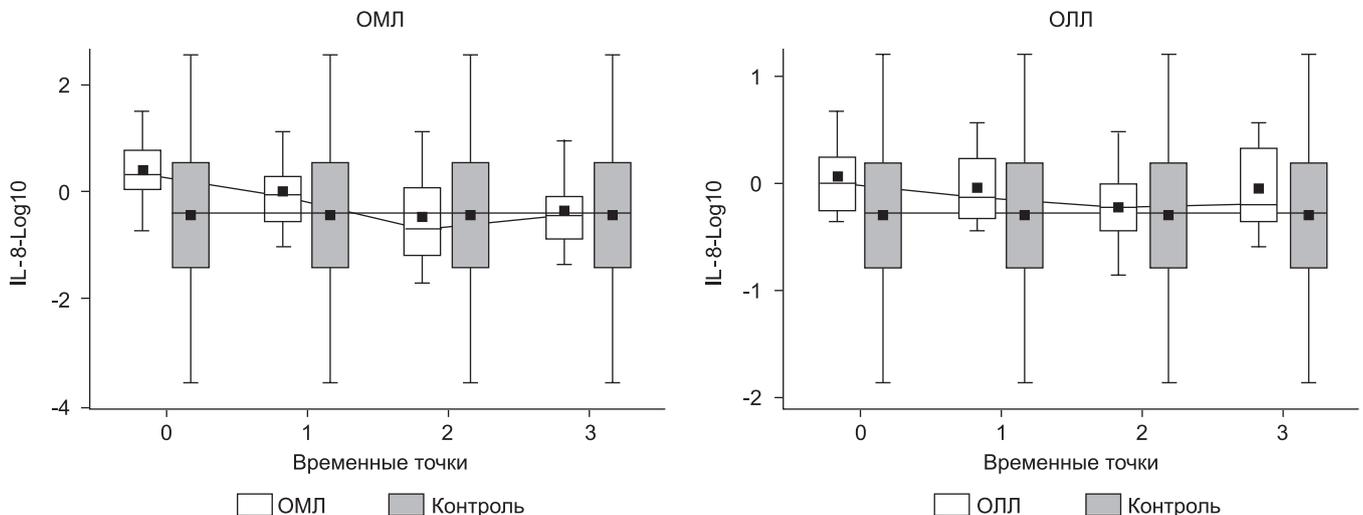


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии гена *IL-8* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

Экспрессия генов, ответственных за способность ММСК к самоподдержанию, миграции и дифференцировке

В дебюте заболевания отмечалось снижение уровня экспрессии гена фактора роста фибробластов *FGF2*, который нормализовался в дальнейшем, а также генов рецепторов к нему – *FGFR1* и *FGFR2* (рис. 7). У больных ОМЛ уровень экспрессии гена *FGFR1* на момент диагностики заболевания составил $1 \pm 0,08$, а на точке после консолидации – $-0,2 \pm 0,03$, перед поддерживающей терапией – $-0,1 \pm 0,01$, в группе больных ОЛЛ – $-0,3 \pm 0,06$ ($p < 0,05$). При изучении ди-

намики изменения уровней *FGFR2* наблюдались те же закономерности.

В дебюте была продемонстрирована повышенная экспрессия гена *VCAM*, которая снижалась в ходе терапии. При исследовании на последней точке его уровень у больных ОМЛ составлял $0,6 \pm 0,1$, у больных ОЛЛ – $-0,9 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) – 10 и 50% от данного показателя у здоровых доноров соответственно.

В ходе работы продемонстрировано уменьшение уровня экспрессии гена *ICAM* до $0,03 \pm 0,004$ у больных ОМЛ и $0,04 \pm 0,01$

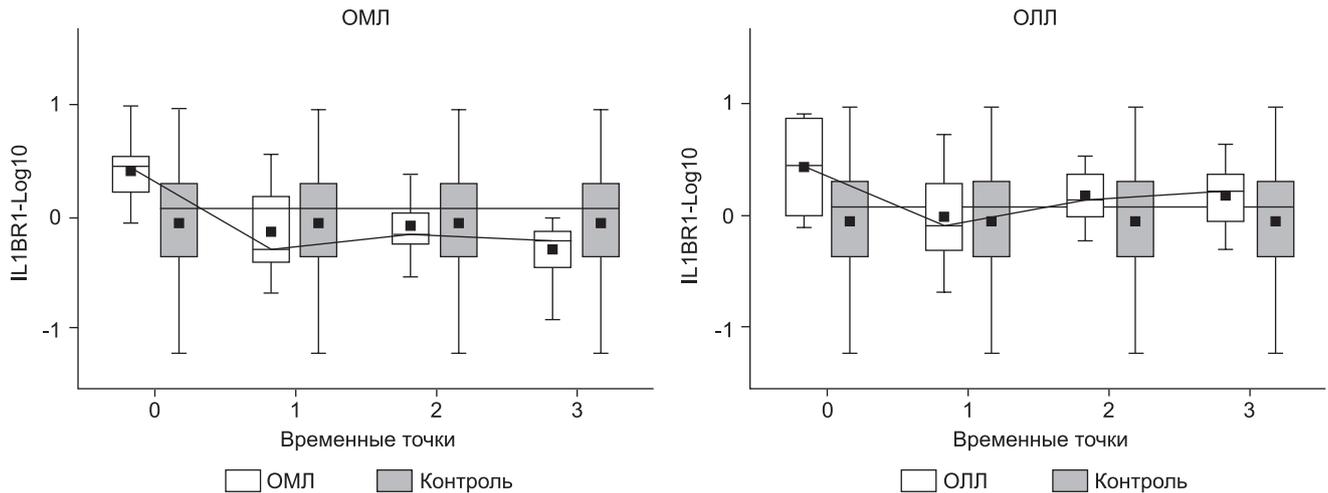


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии гена *IL-1R1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

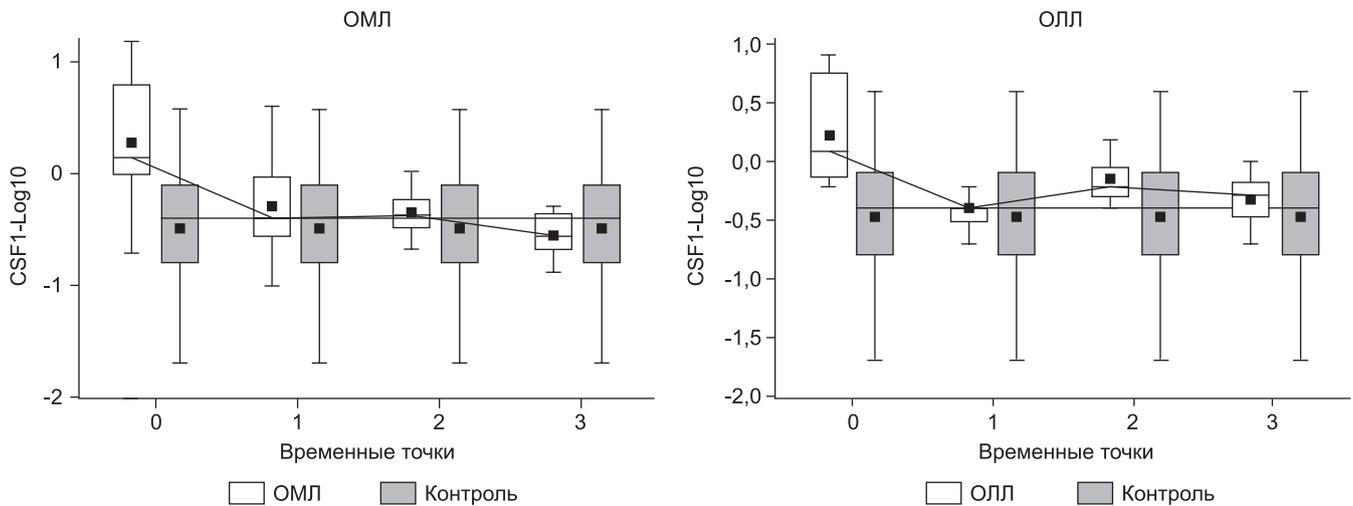


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии гена *CSF1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

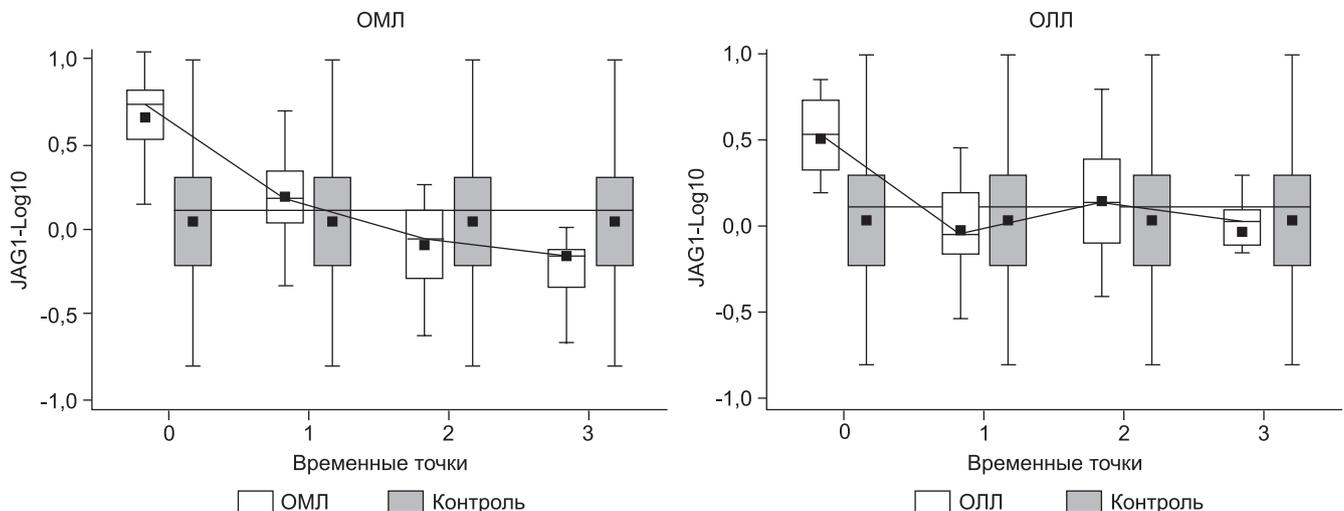


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии гена *JAG1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

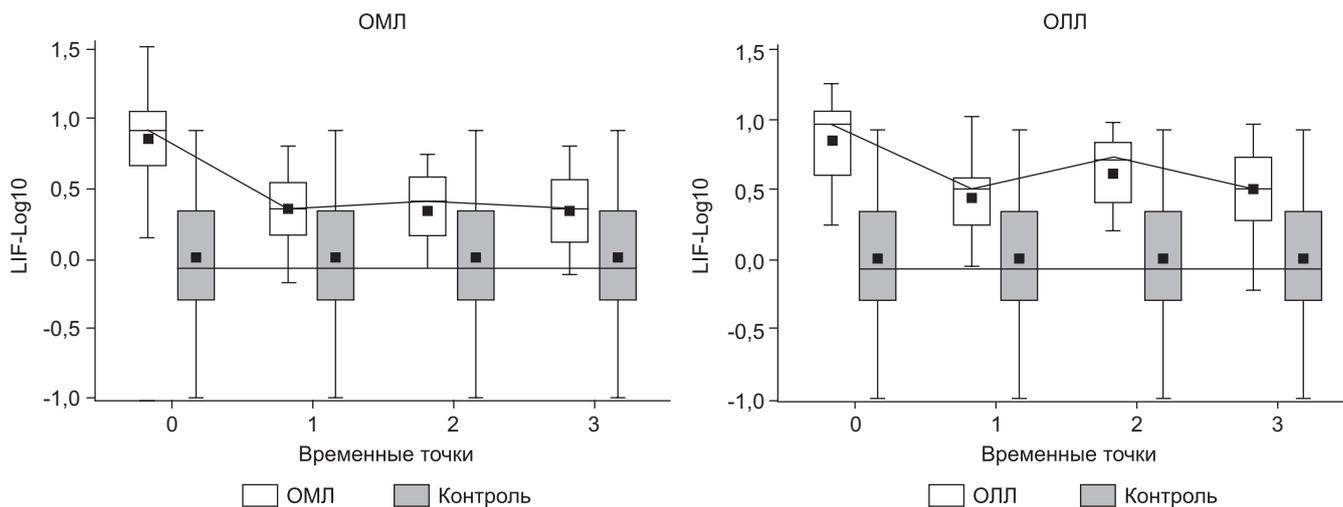


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии гена *LIF* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

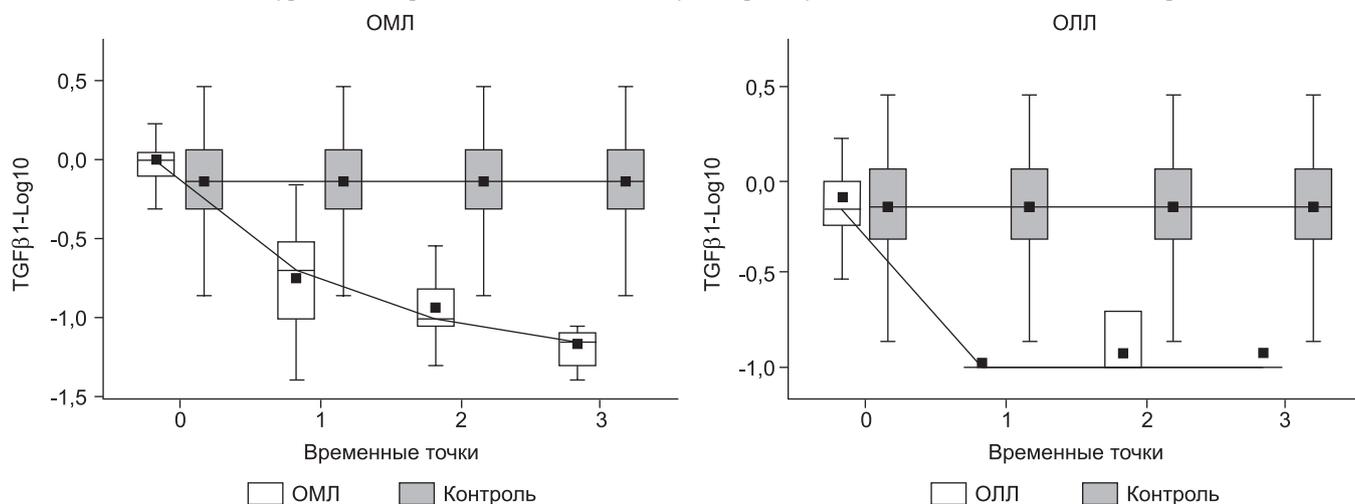


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии гена *TGFβ1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

($p < 0,05$) у больных ОЛЛ (10% от группы здоровых доноров) перед поддерживающей терапией. Уровень его экспрессии был нормальным в дебюте заболевания в обеих группах больных (рис. 8).

Во всех группах больных на нулевой точке наблюдался повышенный уровень экспрессии гена инсулинподобного фактора роста *IGF1*. На последующих точках наблюдалось статистически значимое снижение уровня его экспрессии (рис. 9). На точке перед поддерживающей терапией его уровень у больных ОМЛ составил $0,2 \pm 0,05$ ($p < 0,05$), что соответствует 10% от уровня экспрессии у здоровых доноров.

Экспрессия генов, ответственных за морфогенез ММСК
Было показано значительное снижение уровня экспрессии гена *BGLAP* в дебюте заболевания во всех группах больных. У больных ОМЛ – до $0,7 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), т.е. до 20% от уровня аналогичного показателя у здоровых доноров, и увеличение его уровня в ходе терапии (рис. 10). На всех точках во всех группах пациентов выявлено стойкое снижение экспрессии гена *SOX9*, уровень которого снижался с $1,1 \pm 0,14$ у больных ОМЛ и $1 \pm 0,2$ у больных ОЛЛ до $0,1 \pm 0,01$ и $0,15 \pm 0,01$ ($p < 0,05$) соответственно.

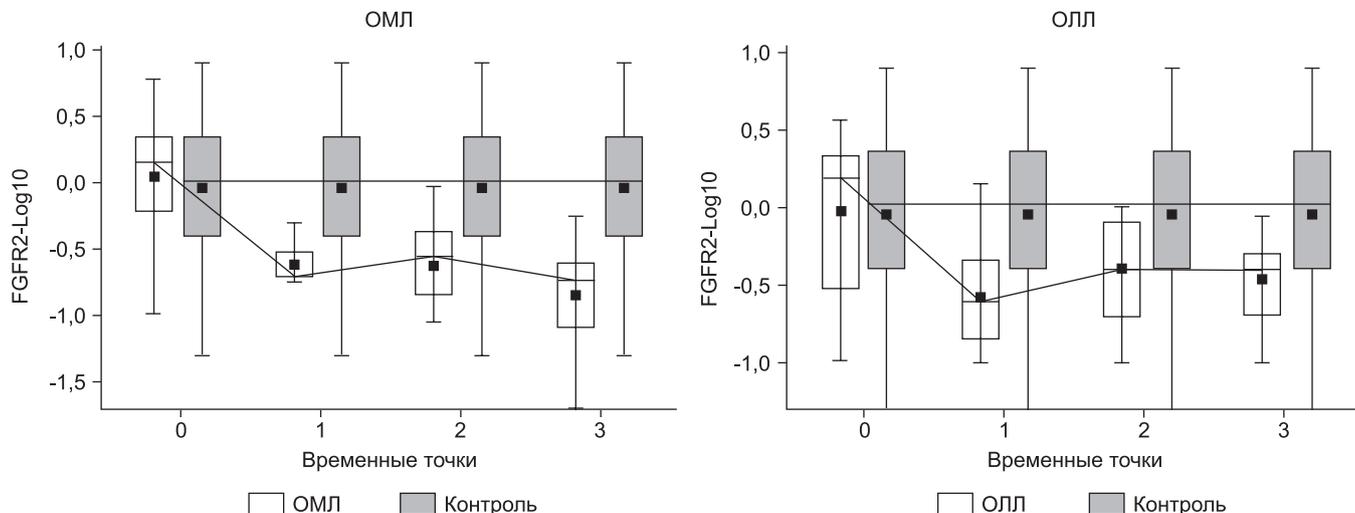


Рис. 7. Относительный уровень экспрессии гена *FGFR2* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

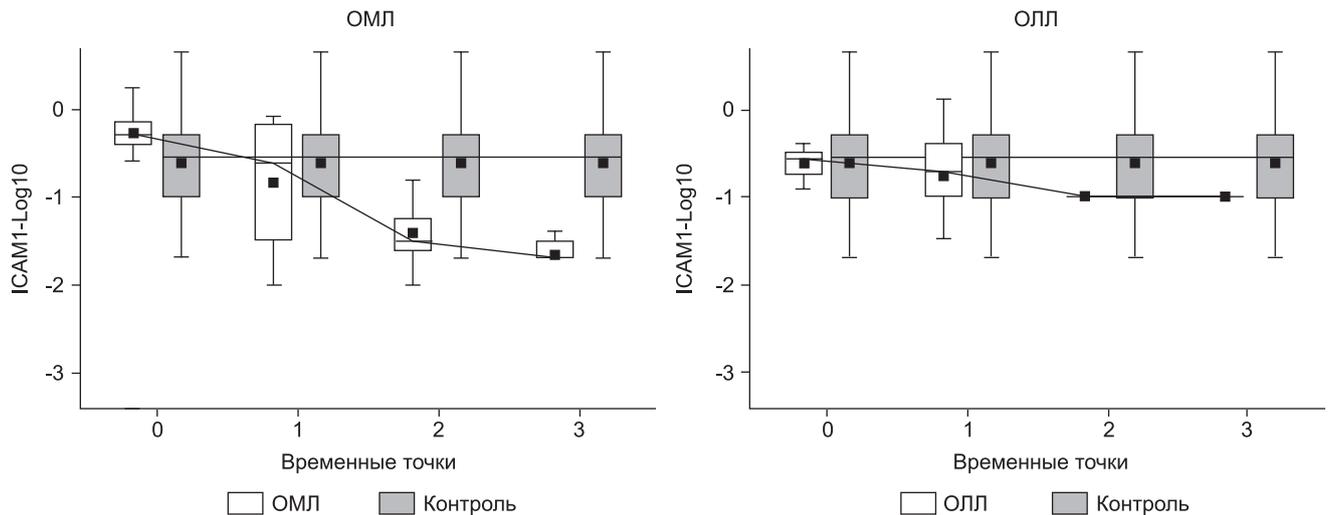


Рис. 8. Относительный уровень экспрессии гена *ICAM* в ММСК у доноров и у больных ОМЛ и ХМЛ до и в процессе лечения.

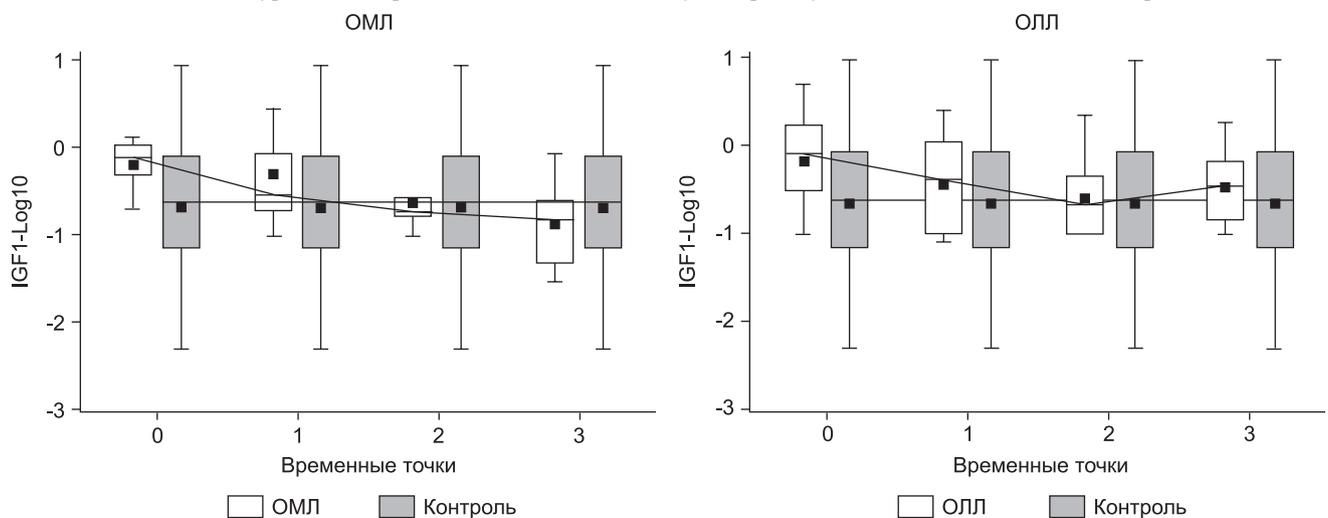


Рис. 9. Относительный уровень экспрессии гена *IGF1* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

Анализ экспрессии генов в ММСК больных лейкозами в зависимости от статуса заболевания

В группе больных ОМЛ после первого курса индукции 42% больных находились вне ремиссии заболевания, при этом у подгрупп больных в ремиссии заболевания и вне ее имелись различия. У больных вне ремиссии ОМЛ наблюдалось повышение уровня экспрессии генов *CSF*, *IGF* и *JAG1*, а также снижение уровней генов *SPP1*, *BGLAP* и *SOX9* по сравнению с группой в ремиссии. К моменту

исследования после курса консолидации эти различия сохранялись. Такие же закономерности наблюдались при ретроспективном анализе тех же групп в момент диагностики заболевания.

В группе больных ОЛЛ к моменту 1-й точки ремиссия не была достигнута только у 3 больных, в связи с чем оценивать такую немногочисленную группу с использованием *t*-критерия Стьюдента не представляется возможным. Поэтому для анализа различий в этих группах применяли 95% доверительный интервал (ДИ), построен-

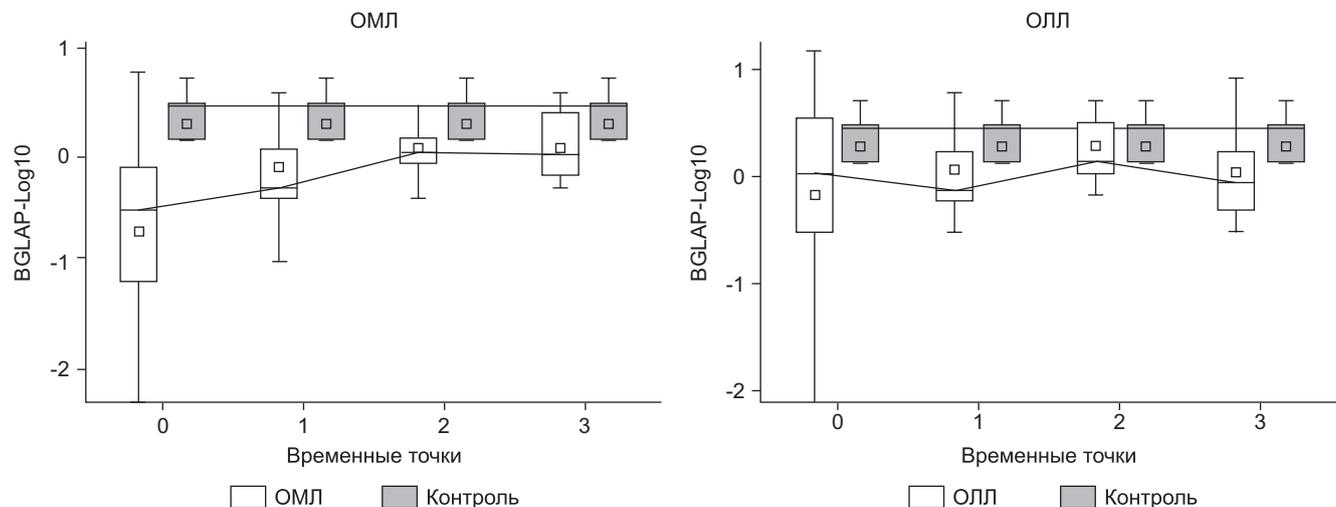


Рис. 10. Относительный уровень экспрессии гена *BGLAP* в ММСК у доноров и у больных гемобластозами до и в процессе лечения.

ный для значений в группе больных в ремиссии. Было показано, что у больных вне ремиссии заболевания уровни экспрессии генов *IL-6*, *FGF2*, *VCAM* были выше, чем у больных в ремиссии заболевания.

Анализ экспрессии генов в ММСК больных лейкозами в зависимости от протокола терапии

Учитывая разный состав цитостатических препаратов, а также их дозы, проанализированы уровни экспрессии генов в зависимости от лечения. Всем больным ОМЛ после установления диагноза начата терапия по протоколу ОМЛ 01.10. Таким образом, все больные на точках 0 и 1 не различались по этому критерию. После оценки эффективности на 1-й точке несколько больным терапия была заменена на терапию малыми дозами цитарабина (МДЦ). На 2-й точке в этой группе больных уровни экспрессии некоторых генов выходили за границы ДИ. Показано, что у больных, получавших лечение МДЦ, была повышена экспрессия генов *IL-6*, *VCAM*, *TGFβ1*.

Обсуждение

Спектр эффектов, оказываемых продуктами экспрессии изучаемых генов, широк и разнообразен, поэтому в рамках данного исследования мы останавливались только на тех, что могут играть роль в патогенезе гемобластозов. Например, интерлейкин-6 является провоспалительным цитокином и обладает мощным иммуносупрессивным действием, подавляя цитотоксичность НК-клеток в отношении бластных клеток. Кроме связывания гемопоэтических клеток с ЛСК интерлейкин-6 приводит к остановке клеточного цикла в ЛСК и переходу их в состояние покоя. Возможно, повышенная экспрессия гена *IL-6* в дебюте заболевания отражает создание более благоприятных условий для лейкозных клеток. Интерлейкин-8 стимулирует пролиферацию бластных клеток, а также ангиогенный потенциал ММСК через увеличение содержания VEGF. Таким образом, повышенный уровень интерлейкина-8 на момент диагностики также способствует лейкоэмической экспансии, а снижение уровня его экспрессии свидетельствует об эффективности терапии. Интерлейкин-1β является провоспалительным цитокином, который стимулирует пролиферацию бластных клеток, что также может говорить о создании более благоприятных условий для лейкозных клеток.

КСФ помимо стимуляции пролиферации и дифференцировки нейтрофилов оказывает влияние и на лейкозные клетки. Повышение уровня его экспрессии в дебюте может свидетельствовать о создании благоприятных условий для лейкозных клеток, а его нормализация в ходе лечения – о восстановлении сигнальных путей в клетках стромального микроокружения. В ММСК больных острыми лейкозами была выявлена повышенная экспрессия *JAG1*. Так как *JAG1* оказывает антиапоптотический эффект на лейкозные клетки, то значимое снижение его экспрессии на последующих точках может свидетельствовать об эффективности терапии. Продукт экспрессии *SPP1* (остеопонтин) регулирует число ГСК в КМ и является важным фактором активации остеокластов. Повышенная его экспрессия в дебюте может свидетельствовать об усилении остеокластогенеза и повышении резорбции кости в дебюте заболевания. Продукт экспрессии гена *LIF* в своем действии сходен с *IL-6* и ингибирует процессы дифференцировки клеток. Таким образом, снижение уровня его экспрессии может говорить об эффективности проводимой терапии.

В ходе исследования изучались уровни экспрессии генов ростовых факторов. Например, белки семейства трансформирующего ростового фактора (*TGFβ*) действуют как антипролиферативные факторы для ГСК, ингибируя пролиферацию клеток. Кроме того, *TGFβ* вовлечен в сигнальный путь SMAD, который является пусковым механизмом апоптоза. Таким образом, уменьшение его экспрессии ослабляет антипролиферативные эффекты *TGF*, восстанавливая механизмы нормальной регуляции клеток в ходе терапии. Фактор роста фибробластов *FGF2* обладает широким спектром митогенной активности и стимулирует пролиферацию стромальных клеток. Нормализация уровня его экспрессии в ходе терапии отражает ее эффективность и восстановление микроокружения. Были показаны стимулирующие эффекты инсулиноподобного фактора роста *IGF*, в том числе на бластные клетки. Кроме того, доказано повышение уровня *IGF1* с возрастом, коррелирующее с развитием миелодисплазии. Снижение уровня его экспрессии отражает эффективность терапии.

В ходе терапии также показано снижение уровней экспрессии генов молекул клеточной адгезии. Высокая экспрессия гена *VCAM* способствует экстравазации лейкозных клеток через стенку сосуда, усиливает ангиогенез, а также способствует выживаемости лейкозных клеток, взаимодействуя с *VLA-4*. Другая молекула адгезии (*ICAM*) регулирует миграцию клеток, а также адипогенную дифференцировку ММСК. Кроме того, *ICAM* проявляет иммуномодулирующую активность за счет подавления дифференцировки Th17-клеток.

В работе изучали гены маркеров остеогенеза. *BGLAP* является маркером позднего остеогенеза, поэтому сниженный уровень экспрессии его гена отражает ингибирование дифференцировки ММСК, а сниженная экспрессия *SOX9* отражает ингибирование ходрогенной дифференцировки ММСК при развитии лейкоза.

У больных, находящихся вне ремиссии ОМЛ, наблюдалось повышение уровня экспрессии генов, ответственных за регуляцию кроветворения, таких как *CSF*, *IGF* и *JAG1*, которые обладают способностью к стимуляции пролиферации лейкозных клеток. Также у больных вне ремиссии ОМЛ были выявлены сниженные по сравнению с группой в ремиссии уровни генов, продукты экспрессии которых являются маркерами дифференцировки ММСК – *SPP1*, *BGLAP* и *SOX9*. В группе больных ОЛЛ вне ремиссии заболевания уровни экспрессии генов *IL-6* и *VCAM* были выше, чем у больных в ремиссии заболевания. Таким образом, при анализе групп больных в ремиссии заболевания и вне ее были подтверждены вышеописанные закономерности о большем поражении стромы у больных в развернутой стадии гемобластозов.

У больных, получавших лечение МДЦ, была повышена экспрессия генов *IL-6*, *VCAM*, *TGFβ1*, ингибирующих пролиферацию и дифференцировку ММСК, что может свидетельствовать о большем поражении стромы у больных, получающих лечение по этому протоколу, несмотря на относительно меньшую его гематологическую токсичность.

Выводы

Показано, что ММСК из КМ больных ОМЛ и ОЛЛ морфологически не различаются от таковых, полученных у здоровых доноров.

При оценке экспрессии генов в ММСК продемонстрировано повышение в дебюте заболевания уровней экспрессии генов, продукты которых способствуют пролиферации лейкозных клеток (*IL-6*, *IL-8*, *IL-1β*, *CSF*, *JAG1*, *SPP1*, *SDF1*) и ингибируют пролиферацию и миграцию стромальных клеток (*ICAM*, *VCAM*). В ходе терапии уровни экспрессии этих генов снижаются. В ходе лечения гемобластозов повышаются уровни экспрессии генов, продукты которых отвечают за пролиферацию, миграцию и дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, что отражает восстановление стромального микроокружения в процессе терапии (*IL-1R1*, *PDGFRα*, *IGF*, *FGFR1*, *FGFR2*, *BGLAP*).

Обнаружено, что у больных вне ремиссии заболевания ингибирование стромы глубже по сравнению с больными, достигшими ремиссии заболевания. У больных на фоне длительного низкодозного цитостатического воздействия обнаруживается снижение уровней экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку стромальных клеток, по сравнению с больными, получающими импульсную высокодозную химиотерапию.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-00457 «Влияние лейкозных клеток на кроветворное стромальное микроокружение человека», руководитель Шипунова Ирина Николаевна.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Krampera M., Pizzolo G., Aprili G., Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006; 39(4): 678–83.
2. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991; 9(5): 641–50.
3. Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., et al. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; 466(7308): 829–34.
4. Bruns I., Caddeu R.P., Brueckmann I., Frobel J., Geyh S., Bust S., et al. Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2012; 120(13): 2620–30.
5. Suragani R.N., Cadena S.M., Cawley S.M., Sako D., Mitchell D., Li R., et al. Transforming growth factor-β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat. Med.* 2014; 20(4): 408–14. doi: 10.1038/nm.3512.
6. Chertkov J.L., Gurevitch O.A., Udalov G.A. Role of bone marrow stroma in hemopoietic stem cell regulation. *Exp. Hematol.* 1980; 8(6): 770–8.
7. Eppert K., Takenaka K., Lechman E.R., Waldron L., Nilsson B., van Galen P., et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* 2011; 17(9): 1086–93.
8. Gentles A.J., Plevritis S.K., Majeti R., Alizadeh A.A. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*. 2010; 304(24): 2706–15.
9. Fiedler W., Graeven U., Ergün S., Verago S., Kilic N., Stockschrader M., et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 1997; 89(6): 1870–5.
10. Aguayo A., Estey E., Kantarjian H., Mansouri T., Gidel C., Keating M., et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 94(11): 3717–21.

11. Loges S., Heil G., Bruweleit M., Schoder V., Butzal M., Fischer U., et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(6): 1109–17.
12. Perez-Atayde A.R., Sallan S.E., Tedrow U., Connors S., Alred E., Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Pathol.* 1997; 150(3): 815–21.
13. Mirshahi P., Rafii A., Vincent L., Berthaut A., Varin R., Kalantar G., et al. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia.* 2009; 23(6): 1039–48.
14. Colmone A., Amorim M., Pontier A.L., Wang S., Jablonski E., Sipkins D.A. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science.* 2008; 322(5909): 1861–5.
15. Corre J., Mahtouk K., Attal M., Gadelorge M., Huynh A., Fleury-Cappellesso S., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia.* 2007; 21(5): 1079–88.
16. Roela R.A., Carraro D.M., Brentani H.P., Kaiano J.H., Simao D.F., Guarnieiro R., et al. Gene stage-specific expression in the micro-environment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2007; 31(5): 579–89.
17. Frisch B.J., Ashton J.M., Xing L., Becker M.W., Jordan C.T., Calvi L.M. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 119(2): 540–50. doi: 10.1182/blood-2011-04-348151.
18. Krevvata M., Silva B.C., Manavalan J.S., Galan-Diez M., Kode A., Matthews B.G., et al. Inhibition of leukemia cell engraftment and disease progression in mice by osteoblasts. *Blood.* 2014; 124(18): 2834–46.
19. Geyh S., Rodríguez-Paredes M., Jager P., Khandanpour C., Cadeddu R.P., Gutekunst J., et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016; 30(3): 683–91.
20. Hanoun M., Zhang D., Mizoguchi T., Pinho S., Pierce H., Kunisaki Y., et al. Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2014; 15(3): 365–75.
21. Huan J., Hornick N.I., Shurtleff M.J., Skinner A.M., Goloviznina N.A., Roberts C.T., et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res.* 2013; 73(2): 918–29.
22. Calkoen F.G., Vervat C., Eising E., Vijfhuizen L.S., 't Hoen P.B., van den Heuvel-Eibrink M.M., et al. Gene-expression and in vitro function of mesenchymal stromal cells are affected in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2015; 100(11): 1434–41. doi: 10.3324/haematol.2015.126938.
23. Mudry R.E., Fortney J.E., York T., Hall B.M., Gibson L.F. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood.* 2000; 96(5): 1926–32.
24. Ayala F., Dewar R., Kieran M., Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia.* 2009; 23(12): 2233–41.
25. Blau O. Bone marrow stromal cells in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2014; 19: 171–80.
26. Konopleva M., Zhao S., Hu W., Jiang S., Snell V., Weidner D., et al. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* 2002; 118(2): 521–34.
27. Konopleva M., Konoplev S., Hu W., Zaritskey A.Y., Afanasiev B.V., Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia.* 2002; 16(9): 1713–24.

Поступила 10.05.16

Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.419-085.361.4-013.3-076.5:577.2.08

Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Баторова Д.С., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ CD4⁺ Т-КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛУ CD31, У БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, г. Новосибирск, Россия

Цель работы – исследование динамики восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и ранее не описанной субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток у больных лимфопролиферативными заболеваниями после высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). В исследование вошли 87 больных. Методом проточной цитометрии оценивали количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ и CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток перед ауто-ТГСК, на день выхода из лейкопении, через 6 и 12 мес после ТГСК. Относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток значимо повышено у больных по сравнению со здоровыми лицами и восстанавливается после ауто-ТГСК до исходных показателей ко дню выхода из лейкопении. Посттрансплантационная лучевая терапия на область средостения приводит к значимому снижению количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и удлиняет период их восстановления. Облучение мягких тканей не приводит к значимому снижению этой субпопуляции клеток. При изучении восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии нужно исключить из исследования CD31⁺ Т-клетки памяти.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тимопоэз; CD31; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; восстановление лимфоцитов.

Для цитирования: Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Баторова Д.С., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Восстановление CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу CD31, у больных лимфопролиферативными заболеваниями после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(3): 133-137. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-133-137

Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Batorova D.S., Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostaniin A.A., Chernykh E.R.

RECOVERY OF CD4⁺ CD31⁺ T-CELL IN PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS FOLLOWING HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

We have evaluated the dynamics of post-transplant recovery of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T cells and CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-cells in patients with lymphoproliferative diseases after high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation (auto-HSCT). 87 patients were included in the study. The content of circulating CD4⁺CD31⁺ naïve and memory T-cells has been assessed with the use of flow cytometry before auto-HSCT, at the day of engraftment, and in 6 and 12 months. Relative amount of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-cells in patients was elevated in comparison with healthy controls, restored rapidly following auto-HSCT and reached initially high level at the day of engraftment. Post-transplant mediastinal radiotherapy significantly reduced counts of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺

T-cells and extended recovery period compared to the non-irradiated patient level. Non-thymic tissue irradiation reduced this subset slightly and non-significantly. The study of the recovery of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺T-cells by virtue of flow cytometry required an accurate gating strategy to exclude CD31⁺T memory cells.

К е у о р д с : thymopoiesis; CD31; hematopoietic stem cell transplantation; lymphocyte recovery.

For citation: Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Batorova D.S., Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Recovery of CD4⁺ CD31⁺ T-cell in patients with lymphoproliferative disorders following hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(3): 133-137. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-133-137

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 14 Oct 2015

Accepted 17 July 2016

Высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) является одним из методов лечения лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ). Восстановление субпопуляционного состава Т-клеток после высокодозной химиотерапии определяет эффективность адаптивного иммунного ответа после ТГСК.

Одним из механизмов реконституции Т-клеток является тимопоз [1]. Несмотря на значительную возрастную и индуцированную повреждениями (в том числе лучевой и химиотерапией) инволюцию, тимус сохраняет способность к регенерации и вносит определенный вклад в количественное восстановление пула периферических Т-клеток и обновление репертуара Т-клеточных рецепторов [2–5]. При этом минимальные уровни Т-клеток, несущих маркеры, недавно покинувших тимус и мигрировавших на периферию, обнаруживаются через 3–6 мес после аллогенной и ауто-ТГСК [6–9]. Позднее накопление на периферии наивных Т-клеток, недавно покинувших тимус, обусловлено как его индуцированной инволюцией, так и недостатком поступающих из костного мозга клеток-предшественников.

Функциональную активность тимуса оценивают по содержанию периферических Т-клеток с признаками недавно произошедшей рearranжировки Т-клеточного рецептора, то есть содержащих в цитоплазме кольцевые молекулы ДНК, состоящие из фрагментов генов Т-клеточного рецептора (T cell receptor excision circles, TREC), методом полимеразной цепной реакции [10]. Помимо высокого содержания TREC мигрирующие из тимуса наивные CD4⁺ Т-клетки несут молекулу CD31 (т.е. имеют фенотип CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺) и отличаются большей длиной теломер и повышенной теломеразной активностью [11].

Исследования [12, 13] показали, что CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клетки в присутствии интерлейкина-7 (ИЛ-7) способны пролиферировать без потери экспрессии CD31, что снижает диагностическую значимость CD31. Однако благодаря относительной простоте определения CD31 этот метод часто применяют для ориентировочной оценки восстановления тимопоза после ауто-ТГСК и аллогенной ТГСК при гематологических и аутоиммунных заболеваниях [6–9, 11]. Поскольку доля CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺ Т-клеток памяти у здоровых доноров не превышает 5–10% в популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов [14–16], отдельными исследователями рассматривается возможность оценки экспрессии CD31 в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток без учета их разделения на наивные клетки и клетки памяти [14, 17].

Ранее мы показали [15], что у больных ЛПЗ на фоне низкого количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток выявляется более высокое по сравнению со здоровыми лицами относительное содержание CD4⁺CD45RA⁺ Т-клеток, экспрессирующих молекулу CD31 (~20%). Данных об экспрессии CD31 Т-клетками памяти у больных гемобластомами, в том числе после высокодозной химиотерапии с ауто-ТГСК, в доступной литературе не обнаружено.

Цель работы – изучение динамики восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток и ранее не описанной субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток у больных ЛПЗ после высокодозной химиотерапии с ТГСК.

Для корреспонденции:

Баторов Егор Васильевич, кандидат мед. наук, научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, г. Новосибирск, Россия. E-mail: Ebatorov@mail.ru.

For correspondence:

Batorov Egor V., MD, PhD, researcher of the Laboratory of Cellular Immunotherapy of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630090, Russia. E-mail: Ebatorov@mail.ru.

Information about authors:

Batorov E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2902-9336>, Scopus Author ID 35768879800; Chernykh E.R., <http://orcid.org/0000-0003-2346-6279>, Researcher ID: K-1052-2014.

Материал и методы

В исследование были включены 87 больных (41 мужчина и 46 женщин) в возрасте от 19 до 62 лет (медиана 37 лет), которым в период с января 2010 по июнь 2015 г. была проведена высокодозная химиотерапия с ауто-ТГСК на базе клиники иммунопатологии НИИФКИ. Неходжжкинские лимфомы (НХЛ) были диагностированы у 21, лимфома Ходжкина (ЛХ) – у 30 и множественная миелома (ММ) – у 36 больных. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия пациентов. В качестве группы сравнения были обследованы 19 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту.

Мобилизацию CD34⁺CD45⁺ гемопоэтических стволовых клеток проводили с помощью разных режимов химиотерапии (ХТ) с последующим введением препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ, 5–10 мкг/кг в день). Процедуру афереза проводили на сепараторах клеток крови ASTEC 204 (Fresenius) и Spectra LRS 07 (COBE) после достижения в периферической крови концентрации 1×10^4 CD34⁺CD45⁺ клеток/мл и продолжали до получения $\geq 2 \times 10^6$ CD34⁺CD45⁺ клеток/кг. Больные НХЛ и ЛХ ($n = 51$) получали режим кондиционирования BEAM, больные ММ ($n = 36$) высокодозный мелфалан (140–200 мг/м²). Средняя доза трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток составила $5,9 \pm 0,4 \times 10^6$ клеток/кг ($2,5–25 \times 10^6$ клеток/кг).

Исследование Т-клеточных субпопуляций проводили у пациентов до ауто-ТГСК (перед началом кондиционирования, $n = 61$), после ТГСК в день выхода из лейкопении (лейкоциты более 1×10^9 /л, в среднем на 13-й день, $n = 47$), через 6 ($n = 48$) и 12 мес ($n = 37$). Число больных на контрольных точках варьировало в связи с невозможностью в ряде случаев получить образцы крови. В исследование не были включены данные пациентов, которым после ауто-ТГСК проводили ХТ или

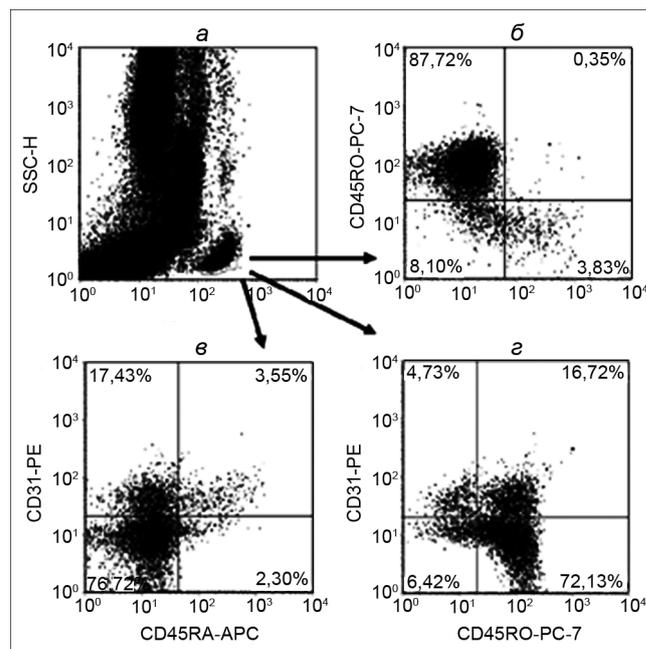


Рис. 1. Цитометрическая характеристика CD4⁺CD31⁺ Т-лимфоцитов.

Показана область гейтирования CD4⁺ Т-лимфоцитов (а), в которой определяли экспрессию на клетках CD45RA, CD45RO, CD31. Показано отсутствие одновременной экспрессии молекул CD45RA и CD45RO на CD4⁺ Т-клетках (б). Относительное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺-клеток (в) (17,43%) сопоставимо со значением CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺-клеток (з) (16,72%).

Представлены данные репрезентативного пациента. Здесь и на рис. 2–4: относительное содержание, % от CD4⁺ Т-клеток.

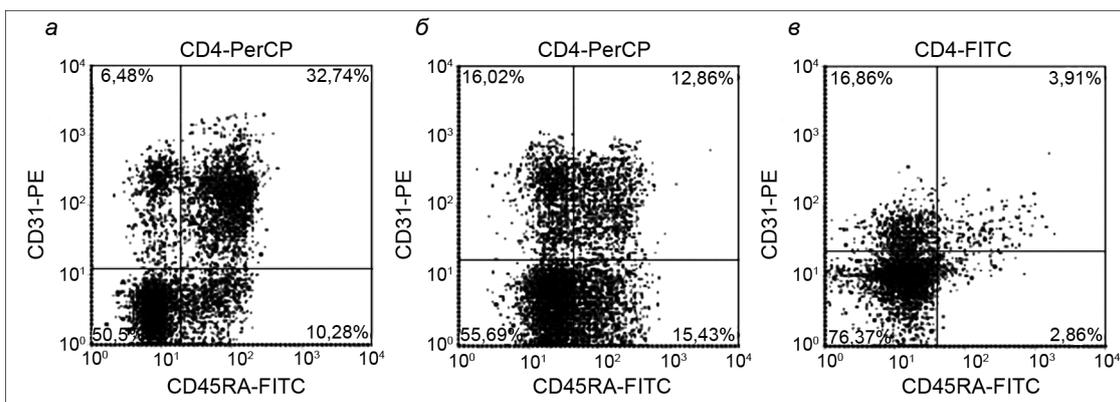


Рис. 2. Цитометрическая характеристика CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток.

Показана экспрессия молекулы CD31 на CD45RA⁺ (верхние правые квадранты) и CD45RA⁻ (верхние левые квадранты) CD4⁺ T-клетках здорового донора (а) и больного перед ТГСК (б) и в день выхода из лейкопении (в). Представлены данные репрезентативных донора и пациента.

повторную ауто-ТГСК. Монотерапия бортезомибом у больных ММ после ауто-ТГСК к исключению из исследования не приводила.

Общий анализ крови оценивали на автоматическом гематологическом анализаторе Nema-Screen 18 ("Hospitex Diagnostics", Италия). Методом проточной цитометрии оценивали относительное содержание CD45RA⁺CD31⁺, CD45RA⁺CD31⁻ и CD45RO⁺CD31⁺ T-клеток периферической крови в гейте CD4⁺ лимфоцитов, используя анти-CD4 (FITC, «Сорбент-сервис», Россия; PerCP, "BD Biosciences", США), анти-CD45RA (FITC, "BD Biosciences", США; APC, "Beckman Coulter", Франция), анти-CD45RO (PC7, "Beckman Coulter", Франция), анти-CD31 (PE, "BD Biosciences", США) моноклональные антитела в соответствии с инструкциями производителей. Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP, PC7), FL-4 (APC) ("BD FACSCalibur", США). В тексте относительное содержание описываемых субпопуляций представлено в виде процента от CD4⁺ T-клеток.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 ("StatSoft"). Для оценки значимости различий между группами больных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни для непрерывных переменных. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Для изучения динамики восстановления CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ и CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток у больных ЛПЗ был проведен сравнительный анализ относительного и абсолютного количества этих клеток до ТГСК, на момент выхода из лейкопении, через 6 и 12 мес после ТГСК.

Для подтверждения соответствия популяции CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-хелперов клеткам памяти у произвольно взятых пациентов методом проточной цитометрии оценили содержание CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ и CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺ T-клеток, при этом было показано отсутствие одновременной экспрессии молекул CD45RA и CD45RO в исследуемой популяции (рис. 1). Сравнение относительного содержания этих субпопуляций в группе из 45 пациентов подтвердило соответствие CD45RA⁻ T-лимфоцитов CD45RO⁺ клеткам памяти: $18,5 \pm 2$ и $17,1 \pm 2,1\%$ соответственно.

У больных перед ТГСК относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток было ниже по сравнению с донорами (см. рис. 2, а, б; таблицу). На день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК содержание циркулирующих CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺

T-клеток было значимо ниже исходных значений (см. рис. 2, б, в; таблицу). Через 6 мес после ТГСК относительное количество этой субпопуляции восстанавливалось до исходного, через 12 мес достигало значений здоровых доноров (см. таблицу).

В отличие от CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток доля CD4⁺CD45RA⁻CD31⁻ T-клеток больных перед ауто-ТГСК была значимо выше показателей доноров (см. рис. 1, а, б; таблицу). Относительное количество клеток этой субпопуляции быстро восстанавливалось после ауто-ТГСК, значимо не отличаясь от исходных значений уже на день выхода из лейкопении (см. рис. 1, б, в), и оставалось на одном уровне в течение года. На всех исследуемых временных точках относительное содержание CD4⁺CD45RA⁻CD31⁻ T-клеток было значимо выше показателей доноров (см. таблицу).

Динамика восстановления абсолютного количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток в целом соответствовала изменениям их относительного содержания. По сравнению с уровнем этих клеток до ауто-ТГСК количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток на день выхода из лейкопении было ниже такового к 6 мес и значимо выше – через 12 мес. В течение всего периода наблюдения абсолютные показатели CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ T-клеток были ниже значений здоровых доноров (см. таблицу).

Абсолютное количество CD4⁺CD45RA⁻CD31⁺ T-клеток было значимо ниже предтрансплантационного уровня к моменту выхода из лейкопении и не отличалось от него через 6 и 12 мес. При этом длительная лимфопения у больных до и после ауто-ТГСК обуславливала сохранение низкого абсолютного содержания CD4⁺CD45RA⁻CD31⁻ T-клеток на день выхода из лейкопении и отсутствие различий с содержанием до ауто-ТГСК и через 6 мес по сравнению со здоровыми донорами (см. таблицу). Восстановление пула лимфоцитов через 12 мес после ауто-ТГСК приводило к значимому увеличению абсолютного количества этих клеток (см. таблицу).

У 17 больных ЛХ и НХЛ была проведена лучевая терапия (ЛТ) на остаточную опухоль в первые 6 мес после ауто-ТГСК, из них у 11 – на область средостения, у 6 – на лимфатические узлы шеи и образования мягких тканей. Медиана времени от даты ауто-ТГСК до окончания ЛТ составила 2,9 мес, медиана суммарной очаговой дозы – 30 Гр. Для оценки динамики реконструкции исследуемых субпопуляций в условиях нарушенного тимопоэза данные этих больных на этапе 6 и 12 мес представлены отдельно. Также отдельно описаны показатели пациента, которому до ауто-ТГСК была проведена тимомэктомию.

Относительное и абсолютное содержание субпопуляций CD4⁺CD31⁺ T-клеток у больных ЛПЗ до и после ТГСК

Субпопуляция клеток	Здоровые доноры (n = 19)	До ТГСК (n = 50)	Выход из лейкопении (n = 38)	+6 мес (n = 36)	+12 мес (n = 24)
Лимфоциты, × 10 ⁹ /л	1,9 (1,5–2,3)	1,2 (0,8–1,6)*	0,7 (0,6–0,9) ***	1,4 (1,0–2,2)*	1,7 (1,3–2,4) **
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ T-клетки, %	27,5 (22–38,1)	16,5 (6,1–27) *	1,9 (1,4–3) ***	13,7 (6,7–23)*	22,2 (12,5–31,5)
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD31 ⁺ T-клетки, %	9 (7–10)	20 (10,5–27,4)*	15 (8,8–18,8) *	18,3 (14,9–23,3) *	18,5 (12–23,7)*
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ T-клетки, клеток/мм ³	198 (137–319)	54 (24–128)*	6 (3–9)***	43 (18–76) *	95 (56–176) ***
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD31 ⁺ T-клетки, клеток/мм ³	58 (45–81)	72 (36–149)	31 (21–59) ***	46 (36–82)	94 (58–112) *

Примечание. Данные представлены в виде: медиана (нижняя квартиль – верхняя квартиль); Me (LQ–UQ). Относительное содержание в виде процента от CD4⁺ T-клеток.

Представлены данные больных, которым не проводили лучевую терапию после ТГСК: * $p_U < 0,01$ – по сравнению с соответствующими значениями здоровых доноров; ** $p_U < 0,05$ – по сравнению с соответствующими значениями больных до ТГСК.

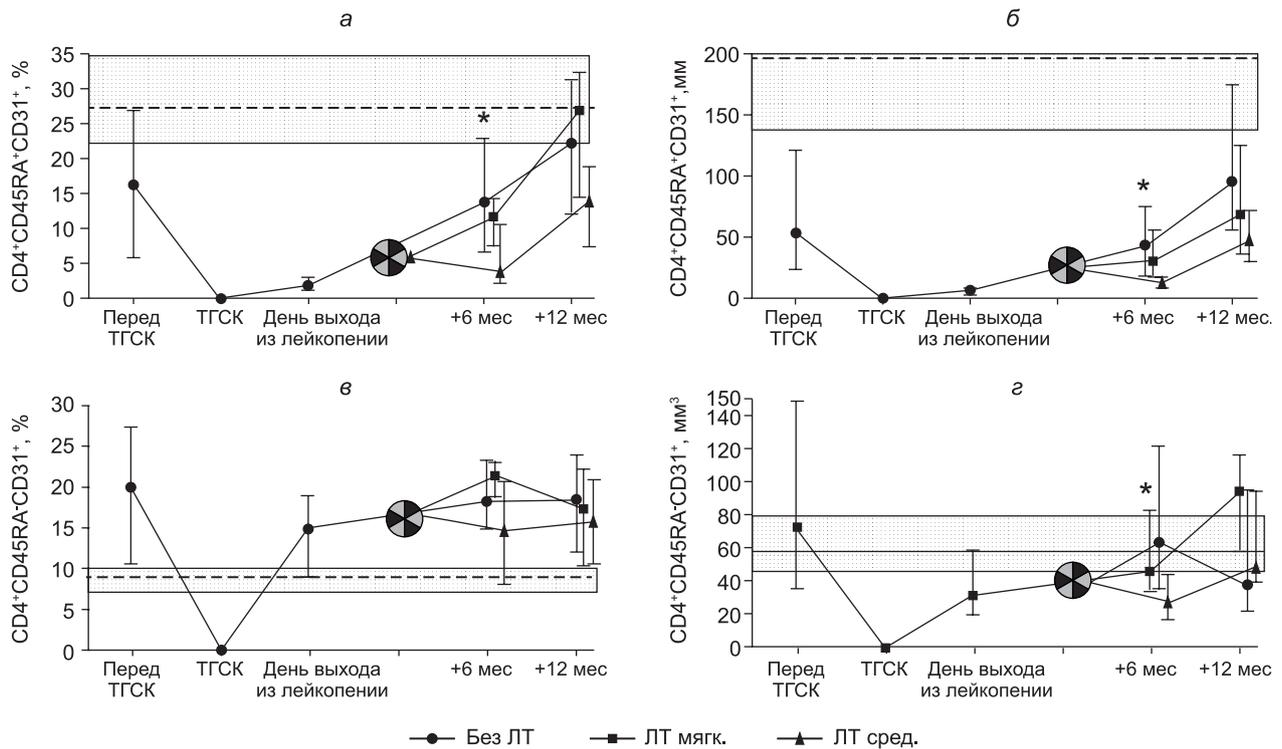


Рис. 3. Влияние лучевой терапии после ТГСК на динамику восстановления $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ и $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток. Схематично представлена динамика восстановления относительного (а, в) и абсолютного (б, г) количества $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ (а, б) и $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ (в, г) Т-клеток больных ЛПЗ без лучевой терапии (сплошная линия), с лучевой терапией на область средостения (штрихпунктирная линия) или мягких тканей (штриховая линия) после ТГСК. ЛТ – лучевая терапия, мягк. – мягкие ткани, сред. – средостение. Пунктирной линией обозначены медианы соответствующих значений здоровых доноров, серой зоной – их интерквартильные диапазоны (а, б – частично). Данные в виде Me (LQ–UQ). * $p_U < 0,05$ в сравнении с соответствующими значениями у больных, которым проводили лучевую терапию на область средостения после ТГСК. Символом обозначена медиана времени окончания лучевой терапии.

У больных после ЛТ на область средостения было отмечено более низкое относительное содержание $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ Т-клеток после ауто-ТГСК, чем у больных оппоритной группы: через 6 мес – 4% (2,4–10%); $p_U = 0,0081$, через 12 мес – 14% (7,4–19%); $p_U = 0,069$ (рис. 3, а). Различия сохранялись и для абсолютных значений: 13 клеток/ mm^3 (9–17 клеток/ mm^3); $p_U = 0,018$ и 48 клеток/ mm^3 (33–72 клеток/ mm^3); $p_U = 0,066$ соответственно (рис. 3, б).

Содержание $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ Т-клеток у больных после ЛТ мягких тканей не различалось от такового у больных с ЛТ на область средостения и у больных, не получавших ЛТ, занимающих промежуточное положение между указанными группами. Через 6 и 12 мес относительное количество этих клеток составило 11,5% (7,6–14,1%) и 27% (15,8–32,5%), абсолютное – 31 клеток/ mm^3 (17–55 клеток/ mm^3) и 70 клеток/ mm^3 (38–125 клеток/ mm^3) соответственно (рис. 3, а, б).

Относительное количество $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток через 6 и 12 мес у больных, которым была проведена ЛТ на область средостения, составило 14,7% (8–21%) и 15,8% (10,7–20,8%), у больных

после ЛТ мягких тканей – 21,4% (18,8–23%) и 17,3% (10,3–21,8%) соответственно. Значимого снижения данной субпопуляции у больных после ЛТ по сравнению с оппоритной группой не наблюдалось (рис. 3, в).

Абсолютное содержание $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток через 6 и 12 мес у больных, которым была проведена ЛТ на область средостения, составило 28 клеток/ mm^3 (18–44 клетки/ mm^3) и 48 клеток/ mm^3 (39–94 клетки/ mm^3), у больных после ЛТ мягких тканей – 64 клеток/ mm^3 (38–121 клетка/ mm^3) и 38 клеток/ mm^3 (23–95 клеток/ mm^3) соответственно. Абсолютное содержание $CD4^+CD45RA^-CD31^+$ Т-клеток у больных после ЛТ на область средостения было значительно ниже такового в группе больных без ЛТ через 6 мес после ауто-ТГСК ($p_U = 0,047$) (рис. 3, г). Вероятно, это было связано с тенденцией к более низкому содержанию лимфоцитов у больных после ЛТ, чем у больных оппоритной группы в эти сроки (1,05 против $1,4 \times 10^9/l$; $p_U = 0,097$).

Отдельно мы представили показатели больного ЛХ, которому в дебюте заболевания (2008) была проведена тимомэктомиа.

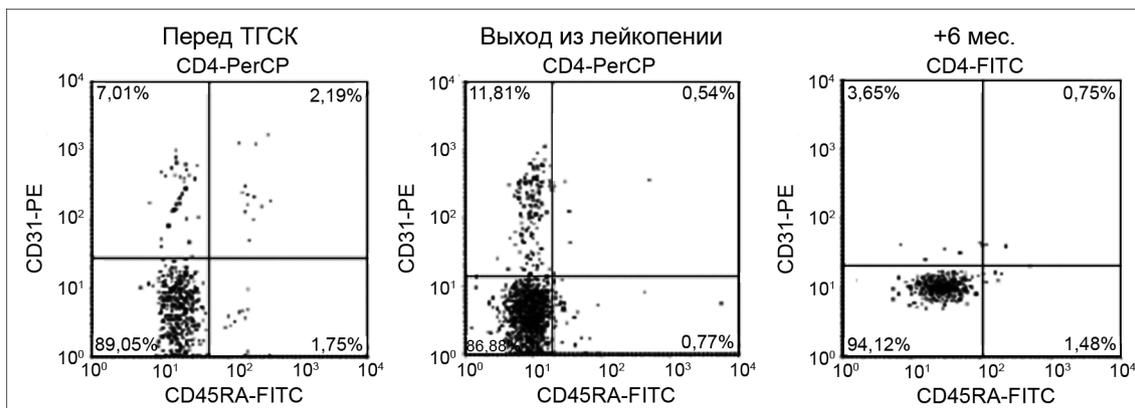


Рис. 4. Цитометрическая характеристика $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ Т-клеток у больного после тимомэктомии.

Показана экспрессия молекулы CD31 на $CD45RA^+$ (верхние правые квадранты) и $CD45RA^-$ (верхние левые квадранты) $CD4^+$ Т-клетках больного после тимомэктомии перед ТГСК (а), в день выхода из лейкопении (б) и через 6 мес после ТГСК (в).

Перед ауто-ТГСК относительное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток составляло 2,19%, после ауто-ТГСК эти клетки практически не определялись: на день выхода из лейкопении – 0,54%, через 6 мес – 0,75% (рис. 4). Абсолютное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток составило 11 клеток/мм³ до ауто-ТГСК, 3 клетки/мм³ на день выхода из лейкопении и 3 клетки/мм³ – через 6 мес.

Относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток перед ауто-ТГСК также было ниже, чем у больных в целом, и составило 7,01%. На день выхода из лейкопении содержание этой субпопуляции увеличивалось до 11,81%, а через 6 мес после ауто-ТГСК снижалось до 3,65% (см. рис. 4). Соответственно, абсолютные значения этой субпопуляции перед ауто-ТГСК составили 36 клеток/мм³, на день выхода из лейкопении – 74 клетки/мм³, через 6 мес – 16 клеток/мм³.

Обсуждение

Учитывая важную роль наивных Т-лимфоцитов, отвечающих за многообразие Т-клеточных рецепторов, в противоионфекционном и противоопухолевом иммунном ответе [13–15], настоящая работа была посвящена изучению динамики восстановления CD4⁺CD31⁺ Т-клеток у больных ЛПЗ после высокодозной химиотерапии с ауто-ТГСК.

Описанные изменения относительного и абсолютного количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток, их длительное постепенное восстановление после высокодозной химиотерапии с ТГСК и после ЛТ соответствуют данным литературы [6–9]. Выраженное снижение этой субпопуляции у больных после ЛТ на область средостения и практически полное их отсутствие у больного после тимомэктомии косвенно подтверждают тимическое происхождение этих клеток.

Некоторое снижение популяции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток у больных после ЛТ мягких тканей, т.е. не повреждавшей ткани средостения, может быть связано с действием локального облучения на данную субпопуляцию на периферии [18, 19]. Известно, что наивные Т-лимфоциты более радиочувствительны, чем клетки памяти. S. Yovino и соавт. [18] ранее отмечали, что локальная ЛТ в суммарной очаговой дозе 20 Гр приводит к облучению 61,5% общего объема крови дозой ≥ 0,5 Гр, при этом *in vitro* было показано, что для эрадикации 50% популяции лимфоцитов достаточно дозы ~2 Гр.

Большой интерес представляет анализ экспрессии молекулы CD31 в популяции CD4⁺ Т-клеток памяти у больных ЛПЗ. Быстрое восстановление количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (CD4⁺CD45RO⁺CD31⁺) Т-клеток после ауто-ТГСК до исходных значений свидетельствует об отсутствии прямой связи этой субпопуляции с недавно мигрировавшими из тимуса в периферическое русло CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клетками. Длительное критически сниженное содержание CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток после ауто-ТГСК ограничивает возможность массовой прямой дифференцировки наивных лимфоцитов в клетки памяти с сохранением экспрессии молекулы CD31. Это подтверждается также отсутствием значимого снижения относительного содержания CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток после ЛТ и сохранением этой субпопуляции после тимомэктомии. Вероятно, часть Т-лимфоцитов (у больных ЛПЗ до 20% CD4⁺ Т-клеток) экспрессирует молекулу CD31 *de novo* после дифференцировки в клетки памяти, однако биологический смысл, а также стимулирующие факторы в настоящее время остаются неясными и требуют дальнейшего изучения.

Ранее было показано [11, 20], что молекулу CD31 (тромбоцитарная/эндотелиальная молекула адгезии 1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1) экспрессируют эндотелиальные клетки, тромбоциты, гранулоциты, наивные Т-клетки, моноциты и дендритные клетки. Функции этого маркера на наивных CD4⁺ Т-клетках многообразны и не до конца изучены [11–13, 20]. Гомофильное связывание молекул CD31 играет роль в трансэндотелиальной миграции. Описана возможность пролиферации CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток без потери экспрессии CD31 при стимуляции ИЛ-7 – основным цитокином, инициирующим и поддерживающим гомеостатическую пролиферацию CD4⁺ Т-клеток [12, 13]. Кроме того, в эксперименте было показано, что на ранних стадиях активации стимуляция CD31 повышает порог чувствительности Т-клеточного рецептора и обеспечивает контролируемую активацию наивных Т-клеток и соответственно их выживаемость [20].

Необходимо отметить, что относительно большой процент CD4⁺ Т-клеток памяти, экспрессирующих CD31, требует аккуратности при интерпретации цитометрических данных относительно восстановления тимопоэза в раннем посттрансплантационном периоде, в частности, необходимости определения экспрессии CD31 именно в популяции CD4⁺CD45RA⁺ Т-клеток, а не в общей популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Полученные данные позволяют сделать несколько заключений:

- Восстановление наивных CD4⁺ Т-клеток за счет CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток происходит в сроки через 6–12 мес

после ауто-ТГСК. ЛТ на область средостения у больных ЛПЗ после высокодозной химиотерапии с ауто-ТГСК значительно уменьшает относительное и абсолютное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток. Облучение иных областей не приводит к значимому снижению этой субпопуляции клеток. Это свидетельствует о зависимости CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток от повреждающих тимус воздействий и об удлинении периода восстановления этих клеток при проведении ЛТ в посттрансплантационном периоде.

- Относительное количество CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток значимо повышено у больных ЛПЗ, чем у здоровых людей. Их быстрое восстановление после ауто-ТГСК и отсутствие связи с изменениями количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток свидетельствуют об экспрессии CD31 молекулы CD4⁺ Т-клетками памяти *de novo*, однако ее функциональное значение на сегодняшний день не изучено.

- При оценке реконституции CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток после ауто-ТГСК методом проточной цитометрии необходимо учитывать возможность экспрессии CD31 на CD4⁺CD45RA⁺ Т-клетках и во избежание завышения результатов следует определять количество CD31-экспрессирующих клеток в субпопуляции CD4⁺CD45RA⁺ Т-клеток.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Хайдуков С.В. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, Th9, Th22 и CD4⁺CD8⁺ дважды положительные Т-клетки. *Медицинская иммунология*. 2013; 15(6): 503–12.
- Баторов Е.В., Блинова Е.А., Тихонова М.А., Лопатникова Ю.А., Крючкова И.В., Баторова Д.С. и др. Влияние клинических факторов на показатели функциональной активности тимуса у больных гемобластозами. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59(3): 16–21.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Mackall C.L., Hakim F.T., Gress R.E. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin. Immunol.* 1997; 9(6): 339–46.
- Goronzy J.J., Lee W.W., Weyand C.M. Aging and T-cell diversity. *Exp. Gerontol.* 2007; 42(5): 400–6.
- Poulin J.F., Viswanathan M.N., Harris J.M., Komanduri K.V., Wieder E., Ringuelet N., et al. Direct evidence for thymic function in adult humans. *J. Exp. Med.* 1999; 190(4): 479–86.
- Sfikakis P.P., Gourgoulis G.M., Moulouopoulos L.A., Kouvatseas G., Theofilopoulos A.N., Dimopoulos M.A. Age-related thymic activity in adults following chemotherapy-induced lymphopenia. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005; 35(6): 380–7.
- Qi Q., Liu Y., Cheng Y., Glanville J., Zhang D., Lee J.Y., et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111(36): 13139–44.
- Ringhoffer S., Rojewski M., Döhner H., Bunjes D., Ringhoffer M. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sTREC/βTREC ratio and thymic naive T cells. *Haematologica*. 2013; 98(10): 1600–8.
- Sairafi D., Mattsson J., Uhlén M., Uzunel M. Thymic function after allogeneic stem cell transplantation is dependent on graft source and predictive of long term survival. *Clin. Immunol.* 2012; 142(3): 343–50.
- Alexander T., Thiel A., Rosen O., Massenkeil G., Sattler A., Kohler S., et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009; 113(1): 214–23.
- Khaydukov S.V. Minor subsets of T-helper cells (Th thymic naive, Th central naive, Th9, Th22 and CD4⁺CD8⁺ double positive T-cells. *Medical immunology. Russian journal (Meditsinskaya immunologiya)*. 2013; 15(6): 503–12. (in Russian)
- Hazenbergh M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2001; 79(11): 631–40.
- Köhler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets. *Blood*. 2009; 113(4): 769–74.
- Chu Y.W., Memon S.A., Sharrow S.O., Hakim F.T., Eckhaus M., Lucas P.J., et al. Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function. *Blood*. 2004; 104(4): 1110–9.
- Azevedo R.L., Soares M.V., Barata J.T., Tendeiro R., Serra-Caetano A., Victorino R.M., et al. IL-7 sustains CD31 expression in human naive CD4⁺ T cells and preferentially expands the CD31⁺ subset in a PI3K-dependent manner. *Blood*. 2009; 113(13): 2999–3007.
- Junge S., Kloeckener-Gruissem B., Zufferey R., Keisker A., Salgo B., Fauchere J.C., et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺(PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(11): 3270–80.
- Batorov E.V., Блинова Е.А., Тихонова М.А., Лопатникова Ю.А., Крючкова И.В., Баторова Д.С., et al. Relationship between clinical factors and functional activity of the thymus in patients with hematological malignancies. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2014; 59(3): 16–21. (in Russian)
- Ruiz-Hernandez R., Jou A., Cabrera C., Noukve F., de Haro J., Borrás F., et al. Distribution of CD31 on CD4 T-cells from cord blood, peripheral blood and tonsil at different stages of differentiation. *Open. Immunol. J.* 2010; 3 (1): 19–26.
- Nausch N., Bourke C.D., Appleby L.J., Rujević N., Lantz O., Trottein F., et al. Proportions of CD4⁺ memory T cells are altered in individuals chronically infected with *Schistosoma haematobium*. *Sci. Rep.* 2012; 2: 472. doi:10.1038/srep00472.
- Yovino S., Kleinberg L., Grossman S.A., Narayanan M., Ford E. The etiology of treatment-related lymphopenia in patients with malignant gliomas: modeling radiation dose to circulating lymphocytes explains clinical observations and suggests methods of modifying the impact of radiation on immune cells. *Cancer Invest.* 2013; 31(2): 140–4.
- Koukourakis G.V., Zambis H., Zacharias G.A., Koukourakis M.J. Post-surgical irradiation causes cellular immune suppression in patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. 2009; 18(3): 306–12.
- Marelli-Berg F.M., Clement M., Mauro C., Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J. Cell Sci.* 2013; 126(Pt 11): 2343–52. doi: 10.1242/jcs.124099.

Поступила 14.10.15
Принята к печати 17.07.16

Воропаева Е.Н.¹, Поспелова Т.И.², Воевода М.И.¹, Максимов В.Н.¹**РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА СТАТУСА ГЕНА TP53 У БОЛЬНЫХ ДИФFUЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ**¹ ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, 630089, г. Новосибирск, Россия; ² ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 630089, г. Новосибирск, Россия

В настоящее время отсутствует комплексное описание изменчивости гена *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (В-ККЛ). В ходе проведенного исследования описаны частота, спектр и функциональная значимость мутаций в гене *TP53* у 74 больных диффузной В-ККЛ г. Новосибирска. Показано, что локализация «горячих точек» мутаций в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ отличалась от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database. Выявлено наличие при диффузной В-ККЛ патогенетически значимых интронных и сэймсенс-замен. Частота метилирования промотора *TP53* в группе исследования составила 5,8%. Потеря гетерозиготности в гене наблюдалась у 25% больных диффузной В-ККЛ и была отмечена только в подгруппе больных с измененным статусом *TP53* (мутации или метилирование промотора). Полученные результаты свидетельствуют, что при диффузной В-ККЛ происходит селекция функционально значимых мутаций в участках *TP53*, кодирующих ДНК-связывающий регион, а недостаточность функции данного гена может формироваться по двухударному принципу.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома; ген *TP53*; метилирование промотора; потеря гетерозиготности; мутации; секвенирование.

Для цитирования: Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Результаты комплексного анализа статуса гена *TP53* у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 138-143. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143

Voropaeva E.N.¹, Pospelova T.I.², Voevoda M.I.¹, Maksimov V.N.¹**THE RESULTS OF COMPLEX ANALYSIS OF TP53 GENE STATUS IN PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE CELL LYMPHOMA**¹Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk, 630089, Russian Federation; ²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

Analysis of the literature shows that there is no comprehensive description of the variability of *TP53* gene in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). The frequency, spectrum and functional significance of mutations in the *TP53* gene were investigated at 74 DLBCL patients. The localization of mutations "hot spots" in the studied sample of patients with DLBCL was shown to be differed from the data presented in IARC *TP53* mutation database. The occurrence of DLBCL with pathogenetic intron and synonymous replacements was revealed. The frequency of *TP53* promoter methylation in the study group was 5.8%. The loss of heterozygosity in the gene was observed in 25% of cases and only in a subset of patients with modified (mutation or promoter methylation) status of the *TP53* gene. The results indicate to the selection of functionally significant mutations in the *TP53* DNA-binding region in DLBCL. The lack of function of the gene in DLBCL was shown to be possibly formed on the two-hit principle.

Key words: gene *TP53*; diffuse large B-cell lymphoma; promoter methylation; loss of heterozygosity; mutations; sequencing

For citation: Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. The results of comprehensive analysis of *TP53* gene status in patients with diffuse large cell lymphoma. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(3): 138-143. (in Russian). DOI:10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143

Funding. The study was executed with the financial support of the Grant of the President of Russian Federation for the State support of leading scientific schools "The role of molecular genetic factors in the formation of predisposition, tumor progression and development of complications of therapy of tumor diseases of the blood system. (project No 10240.2016.7).

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

Received 20 Apr 2016

Accepted 17 July 2016

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (В-ККЛ) – опухоль, характеризующаяся диффузной пролиферацией атипичных крупных лимфоцитов с везикулярным ядром, ярко выраженными ядрышками и базофильной цитоплазмой. Диффузная В-ККЛ составляет около трети случаев неходжкинских лимфом взрослых: до 25–30% в развитых и 30–40% в развивающихся странах, что делает этот вариант лимфом одним из самых частых в мире [1].

Для корреспонденции:

Воропаева Елена Николаевна, кандидат мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, 630083, г. Новосибирск, Россия. E-mail: vena.81@mail.ru.

For correspondence:

Voropaeva Elena N., MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases of the Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk, 630089, Russian Federation. E-mail: vena.81@mail.ru.

Information about authors:

Voropaeva E.N., <http://orcid.org/0000-0001-7542-7285>; Pospelova T.I., <http://orcid.org/0000-0002-1261-5470>; Voevoda M.I., <http://orcid.org/0000-0001-9425-413X>; Maksimov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-7165-4496>.

Этиология диффузной В-ККЛ остается неизвестной. Среди факторов риска заболевания выделяют генетическую предрасположенность (наследственность, полиморфизм генов), коморбидные состояния (иммуносупрессия, инфицирование вирусом Эпштейна–Барр, хроническое воспаление), неблагоприятные воздействия внешней среды (ионизирующее излучение, солнечная радиация, пестициды) и ожирение [1, 2].

Одним из важнейших патогенетических механизмов, лежащих в основе развития В-ККЛ, является генетическая нестабильность клеток лимфоидного ряда как часть нормального развития В-лимфоцитов, которая может приводить к предопухолевым генетическим изменениям. В результате на одном из этапов созревания лимфоидных клеток происходит нарушение В-клеточного гомеостаза с неконтролируемой пролиферацией, блоком дифференцировки и иммортизацией В-лимфоцита [3].

Генетические факторы, нарушающие репарацию ДНК или процесс программированной клеточной смерти, повышают вероятность возникновения предопухолевых событий. Повреждения генома В-лимфоцитов, которые не были репарированы или элиминированы путем апоптоза, в последующем могут модулироваться средовыми воздействиями, эпигенетическими факторами (гипо-гипер-

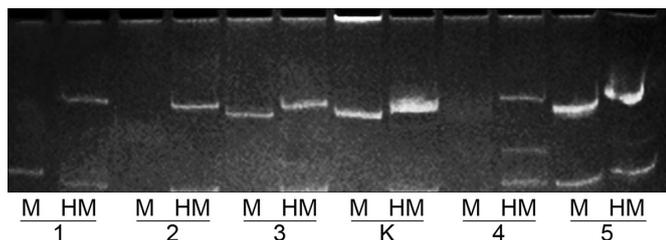


Рис. 1. Анализ статуса метилирования промотора гена *TP53*: результаты метилспецифической ПЦР с фланкирующими праймерами, электрофорез в 8% полиакриламидном геле.

М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю (длина продукта 166 пн), НМ – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю (длина продукта 170 пн), 1–5 номера случаев: 1, 2, 4 – норма; 3, 5 – метилирование; К – контрольные ДНК.

метилирование), сопутствующими заболеваниями (аутоиммунными), генетическим полиморфизмом и запустить дальнейшее развитие опухоли [4].

Белок p53 – ядерный фосфопротеин молекулярной массой 53 кД, основная роль которого заключается в обеспечении экстренного удаления поврежденных и потенциально опасных для организма клеток [5]. Опухольсупрессирующая функция его обусловлена участием в таких процессах, как контроль клеточного цикла, репарация ДНК, апоптоз, старение и аутофагия как через транскрипционно-зависимые, так и транскрипционно-независимые механизмы [6]. Под действием стресса лимфоциты склонны к p53-опосредованному апоптозу в отличие от других типов клеток, подверженных остановке клеточного цикла, p53-независимому апоптозу или некрозу [7]. По этой причине нарушение функции гена *TP53* является основополагающим для развития и прогрессии лимфопролиферативных заболеваний [7, 8].

В В-лимфоцитах с инактивацией *TP53* отмечается увеличение выраженности генетической нестабильности, являющейся промотором дальнейшей опухолевой прогрессии и ускользания злокачественной клетки от иммунной системы, а также терапевтического воздействия. В условиях дефицита его функции увеличивается темп поликлональной эволюции В-клеток с самыми разными генетическими аномалиями: измененным числом и перестройками хромосом, генными мутациями, амплификацией отдельных участков генома [9].

Дисфункция гена *TP53* может быть результатом нарушений в структуре самого гена, изменения процессов транскрипции и стабильности м-РНК, дефекта посттрансляционных модификаций и взаимодействий белка p53. Возможно, молекулярные механизмы на уровне молекулы ДНК, приводящие к дефициту *TP53*, включают генные мутации, метилирование промотора, аллельный дисбаланс и генетический полиморфизм [4].

Анализ базы данных dbSNP [10] показывает, что в гене *TP53* (данные на январь 2016 г.) было зарегистрировано около 700 вариантов однонуклеотидных замен, из них 50 цитируются в базе Pubmed, и только 83 полиморфизма имеют Global MAF более 1%: 4 – миссенс замены, 71 – интронные, 5 – 5'-нетранслируемой и 3 – 3'-нетранслируемой последовательности маркера [11].

Лишь 20 полиморфных вариантов гена *TP53* встречаются в популяции с частотой более 5% и могут представлять реальный клинический интерес. Большинство из них за редким исключением при биоинформационном предсказании не имеет функционального значения [12]. Некоторые из этих полиморфизмов *TP53* в популяциях человека вызывают значимое изменение функции p53, три из них (rs1042522, rs17878362 и rs1625895) хорошо изучены в плане функциональных характеристик, распространенности в популяции и ассоциации с риском опухолей [12]. Проведенные нами ранее исследования [13, 14] показали, что данные маркеры гена *TP53*, в том числе в составе гаплогипных групп, могут быть как факторами риска диффузной В-ККЛ, так и быть ассоциированными с прогрессией заболевания и эффективностью противоопухолевой терапии.

Литературный поиск показывает, что делеция 17p13.1, приводящая к потере гетерозиготности (ПГ) в гене *TP53*, при диффузной В-ККЛ регистрировалась с большим разбросом частот между исследованиями: от 30,4 до 42% по данным китайских авторов [15–17], от 40 до 50,4% – в чешской [18, 19], 30,4% – арабской [20], 22,5% – австрийской популяциях [21]. Наименьшая (22,2%) частота делеции 17p13.1 была показана в исследовании International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study [22], объединяющем выборки больных 16 гематологических центров США, Швейцарии, Нидерландов, Германии, Италии и Испании.

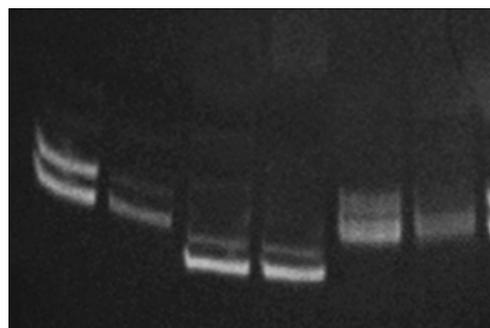


Рис. 2. Анализ микросателлитной нестабильности в локусе D17S796: результаты ПЦР с фланкирующими праймерами, электрофорез в 8% полиакриламидном геле (длина продукта 144–174 пн).

К – ДНК крови, О – ДНК опухолевой ткани, 1–3 номера случаев: 1, 3 – потеря гетерозиготности; 2 – норма.

Наиболее изученным аспектом изменчивости гена *TP53* при диффузной В-ККЛ является анализ его кодирующей последовательности на наличие мутаций. Показано, что частота мутации в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ достигает 20% и более [23].

В 1990 г. была организована база данных IARC *TP53* mutation database для регистрации мутаций в данном гене, которая в настоящее время содержит информацию о более чем 30 000 соматических мутаций и 700 мутациях зародышевой линии [24]. Ее анализ показывает, что при диффузной В-ККЛ в *TP53* описано более 120 мутаций. Из них 95% составили однонуклеотидные замены: 88% – миссенс, 7% – нонсенс-мутации, 5% – мутации со сдвигом рамки считывания. Более 95% мутаций было выявлено в экзонах 5–8 гена, мутации в экзонах 9–11 описаны не были. «Горячими точками» мутаций в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ были следующие кодоны в порядке убывания частоты: 248, 273, 175, 245, 281, 244, 305, 249 и 297 [25].

Однако преобладание так называемых «горячих точек» может меняться в зависимости как от варианта опухоли, так и этнического происхождения исследуемой выборки пациентов [26]. Сравнительный анализ мутаций *TP53* показывает, что их частота и спектр при одном и том же типе онкологической патологии также могут значительно меняться в зависимости от исследуемой популяции [27]. Информация о российской популяции в текущей версии IARC *TP53* mutation database не представлена.

Подавляющее большинство работ, изучающих роль изменений в нуклеотидной последовательности *TP53*, было сосредоточено на анализе 5–8-го экзона гена. Интронные регионы не исследовались. Вместе с тем эти последовательности потенциально могут влиять не только на сплайсинг м-РНК, но и на экспрессию гена, нарушая авторегуляцию процессинга, нормальное прохождение посттранскрипционных модификаций м-РНК и посттрансляционных изменений белка [28–30].

Связь между гиперметилированием промотора *TP53* и снижением уровня транскрипции гена была показана на ряде опухолей [4, 31, 32]. Несмотря на широкое изучение метилирования данного гена при раках, этот вопрос менее изучен при гемобластозах и практически не разработан при лимфопролиферативных заболеваниях [4]. Например, при остром лимфобластном лейкозе метилирование промотора *TP53* регистрируют у трети пациентов [33], а при хроническом лимфолейкозе – в каждом пятом случае [4]. В литературе имеются лишь единичные сообщения о частоте метилирования промотора гена *TP53* при диффузной В-ККЛ [34]. Комплексное описание изменчивости гена *TP53* при диффузной В-ККЛ отсутствует.

Цель исследования – описать частоту гиперметилирования и потери гетерозиготности, а также частоту, спектр и функциональную значимость мутаций в кодирующих и интронных участках гена *TP53* у больных диффузной В-ККЛ г. Новосибирска.

Материал и методы

Группу обследования составили 74 больных диффузной В-ККЛ (35 мужчин и 39 женщин) в возрасте от 21 года до 78 лет (средний возраст $52,8 \pm 14,3$ года), госпитализированных в Городской гематологический центр г. Новосибирска за период 2012–2015 гг. 91% обследованных имели продвинутые (III и IV) стадии заболевания и 2/3 – неблагоприятный прогноз по Международному прогностическому индексу [35].

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом. Все пациенты подписали информированное согласие до включения в исследование.

Таблица 1

Общая характеристика результатов секвенирования

Интронные		В кодирующей последовательности гена <i>TP53</i>			
с неизвестным эффектом	влияние на плайсинг	нонсенс	сдвиг рамки считывания	миссенс	сеймсенс
IVS4-30T>C				p.L130F	
IVS5+43G>T				p.W146R*	
IVS5-17T>C				p.T155I*	p.V157V
IVS7+31G>C*				p.R156C	p.H179H
IVS8+10C>A*	IVS6-36G>C	p.R213X	p.A189Pfs	p.R196Q	p.L252L
IVS8+20A>G				p.G244S	p.V272V
IVS8+37A>G				p.V272E*	p.G302G
IVS9+12T>C*				p.A276V	p.A307A
(rs1800899)				p.G293R	

Примечание. * – мутации, встреченные в группе обследования дважды.

Геномная ДНК была выделена из парафиновых блоков биоптатов опухолевых лимфатических узлов и экстранодальных очагов поражения методом фенольно-хлороформной экстракции с применением гуанидина. На исследование брали срезы ткани, содержащие не менее 80–90% опухолевых клеток.

Прескрининг мутаций не проводили. Методом прямого секвенирования по Сэнгеру был выполнен анализ кодирующей последовательности гена *TP53* (с 5-го по 10-й экзоны) и примыкающих участков интронов, согласно IARC protocol (2010 update) [36]. На первом этапе проводили наработку отдельных фрагментов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК. Полученные ампликоны подвергли очистке от солей, не включившихся праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов на микроколонках с Sephadex G-50 medium ("GE Healthcare Bio-Sciences AB"). Секвенирование образцов осуществляли при помощи наборов BigDye® Terminator v3.1 ("Applied Biosystems") методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems"). Анализ результатов секвенирования, выравнивание и сопоставление с референсной последовательностью (NG_017013) осуществляли с применением программ Chromas, SeqScape v.2.7, Sequence Scanner. Анализ биологической значимости обнаруженных мутаций выполняли с помощью баз данных и инструментов IARC *TP53* Database и The *TP53* UMD mutation database in human cancer [24, 37]. Дополнительно был проведен биоинформационный анализ миссенс-мутаций с помощью on-line программы Polymorphism Phenotyping 2 (PolyPhen-2) [38].

Таблица 3

Результаты функционального анализа миссенс-мутаций гена *TP53*

Мутация	Функциональный прогноз			Активность белка p53 в экспериментах <i>in vitro</i> [ссылка]
	PolyPhen-2 (характер мутации)	SIFT (характер мутации)	Mut_ass (степень патогенности)	
p.L130F	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен [41]
p.W146R	Не патогенная	Нейтральная	Низкая	Незначительно снижена [41]
p.T155I	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [41–43]
p.R156C	Не патогенная	Нейтральная	Низкая	Гиперактивен [41, 44]
p.R196Q	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен [45]
p.G244S	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [42, 46]
p.V272E	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен [41]
p.A276V	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [43]
p.G293R	Не патогенная	Нейтральная	Средняя	Незначительно снижена [41]
p.A276V	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [45]
p.G293R	Не патогенная	Нейтральная	Средняя	Незначительно снижена [41]

Таблица 2

Сравнение спектра выявленных мутаций в гене *TP53* с данными базы IARC ($p > 0,05$)

Тип замены нуклеотида	Частота, %	
	в выборке	в базе данных мутаций в гене <i>TP53</i> IARC
GC>AT в CpG	15,6	26
GC>AT	34,4	25
GC>CG	3,1	8
GC>TA	9,4	10
AT>GC	12,5	13
AT>CG	12,5	5
AT>TA	12,5	8

Бисульфитную конверсию образцов ДНК осуществляли наборами EZ DNA Methylation Kit ("Zymo research", США) согласно протоколу производителя. В реакцию брали 300–500 нг ДНК.

Анализ статуса метилирования промотора гена *TP53* проводили методом метилспецифической ПЦР на бисульфитконвертированной ДНК в двух пробирках: с праймерами, специфичными к метилированному и неметилированному аллелю, согласно методике, описанной ранее [39]. По методологическим причинам анализ статуса метилирования промотора гена *TP53* методом метилспецифической ПЦР был выполнен у 69 больных диффузной В-ККЛ (рис. 1).

Оценку потери гетерозиготности в гене *TP53* проводили по микросателлитному локусу D17S796 методом ПЦР [40]. Для анализа были доступны 24 пары образцов опухолевой и нормальной ткани больных диффузной В-ККЛ группы исследования (рис. 2).

Сравнение частот типов нуклеотидных замен в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ в обследованной выборке больных и в IARC *TP53* mutation database проводили с помощью статистических методов χ^2 -Пирсона и точного критерия Фишера. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Мутации в кодирующей и интронных последовательностях гена *TP53*

В ходе анализа опухолевого материала от 74 больных диффузной В-ККЛ было выявлено 33 мутации: 21 в кодирующей, 12 в интронных последовательностях гена *TP53* (рис. 3, см. на обложке). Распределение мутаций было следующим (табл. 1): 1 (3%) мутация, приводящая к нарушению сплайсинга молекулы РНК, 11 (33%) – интронных с неизвестным эффектом, 12 (37%) – миссенс, 6 (18%) – сеймсенс, 2 (6%) – нонсенс-типа, 1 (3%) – мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания в гене *TP53*.

Все находки за исключением A189Pfs (96,9%) представляли собой одонуклеотидные замены, 5 (15,6%) из которых были мутации типа GC>AT в CpG островках. Замены GC>AT составили 34,4%, GC>CG – 3,1%, GC>TA – 9,4%, AT>GC – 12,5%, AT>CG – 12,5%, AT>TA – 12,5%, что значимо не различается от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database (табл. 2).

Все выявленные нами в исследуемой выборке больных диффузной В-ККЛ мутации в кодирующей последовательности гена *TP53* описаны ранее в IARC *TP53* mutation database [24] при других онкологических заболеваниях и были расположены в 5–8-м экзонах гена.

В обследованной выборке 4 (6,8%) больных имели множественные мутации, а ряд находок встречался неоднократно (в 2 случаях каждая): в кодирующей последовательности – p.W146R, p.T155I, p.V272E, p.R213X, в интронных областях IVS7+31G>C, IVS9+12T>C и IVS8+10C>A (см. табл. 1).

Анализ биологической значимости всех выявленных нами в исследуемой выборке больных диффузной В-ККЛ миссенс-мутаций в гене *TP53* показал следующие данные (табл. 3). Мутации p.L130F, p.T155I, p.R196Q, p.G244S, p.V272E, p.A276V, приводящие к появлению белка, утрачивающего функциональную активность, всеми тремя прогностическими программами были отнесены к повреждающим, вредным или с высокой/средней степенью опасности заменам. Тогда как мутации p.W146R и p.G293R, незначительно снижающие активность p53, а также p.R156C с гиперактивным продуктом, были отнесены к неопасным, нейтральным или с низкой/средней степенью опасности заменам.

Биологическая значимость мутаций p.R213X и p.A189Pfs не вызывает сомнений, поскольку обе они приводят к появлению усеченного белка p53 с нулевой активностью.

Сложнее оценить эффект сеймсенс-мутаций, выявленных в исследуемой выборке, поскольку они являются синонимическими

заменами нуклеотидов, которые характеризуются сохранением смысла кодирующего кодона. Согласно прогнозу *TP53* Mutant assessor, из сеймсенс-мутаций наибольшего внимания заслуживает замена р.А307А ввиду того, что 307-й кодон близок к концу экзона и потенциально может находиться в сайте сплайсинга молекулы РНК [47].

Функциональный эффект большинства интронных мутаций, выявленных в группе больных диффузной В-ККЛ, точно не известен. Одна из биологически значимых мутаций гена *TP53* (IVS6-36G>C) расположена в 6-м интроне гена. Она относится к изменениям, влияющим на сплайсинг, согласно *The TP53 UMD mutation database in human cancer* [24]. В эксперименте *in vitro* было продемонстрировано, что данная замена в отсутствие изменений в кодирующей последовательности гена приводит к выживанию клеток в условиях химиотерапии и длительно ингибирует апоптоз [48].

Среди интронных мутаций также следует отметить IVS4-30T>C ввиду того, что в 4-м интроне *TP53* расположен альтернативный промотор гена, участвующий в синтезе изоформы delta133, которая в норме экспрессируется в лимфоидной ткани [49].

Анализ аллельного дисбаланса и статуса метилирования гена *TP53*

Частота метилирования промотора гена *TP53* в обследованной выборке из 69 больных диффузной В-ККЛ составила 4 (5,8%) и значительно не различалась ($p = 0,5663$) в подгруппах с мутантной – у 1 (4,2%) из 24 и нормальной структурой гена у 3 (6,7%) из 45.

Анализ ПГ в гене *TP53* по микросателлитному маркеру D17S796 был выполнен у 24 больных диффузной В-ККЛ группы исследования, из них у 13 человек обнаружены мутации, у 11 отсутствовали изменения в последовательности гена *TP53*. Были выявлены 6 (25%) случаев ПГ, из них 5 (83,3%) случаев ПГ приходились на больных, у которых в ходе секвенирования были выявлены мутации в последовательности 5–8-го экзона и прилегающих участков интронов *TP53*. В единственном случае ПГ у больного диффузной В-ККЛ без мутаций обнаружено метилирование промотора гена.

Обсуждение

Спектр однонуклеотидных замен, выявленных в группе больных диффузной В-ККЛ, значительно не различался с данными, представленными в IARC *TP53* mutation database. Преобладали (95%) мутации в участках гена *TP53*, кодирующих ДНК-связывающий регион. Мутация р.G293R – единственная из выявленных миссенс-замен, которая не затрагивает функциональнозначимого ДНК-связывающего домена р53.

Анализ базы данных IARC *TP53* mutation database показал, что все функционально значимые мутации, выявленные нами в группе обследования, были описаны ранее при широком круге новообразований человека. Кодоны 196 и 213 при всех опухолях и кодон 244 при гемобластозах вообще и диффузной В-ККЛ в частности являются «горячими точками» мутаций в гене *TP53* [25]. Более того, описаны случаи синдрома LiFraumeni [25], для которого характерно развитие первично-множественных злокачественных новообразований, вызванных герминогенными мутациями р.R213X, р.G244S, р.L130F и р.T155I, аналогичными описанным нами.

В ходе исследования за исключением 244-го кодона не выявлено мутаций в большей части кодонов (248, 273, 175, 245, 281, 305, 249 и 297), для которых в IARC *TP53* mutation database описано наибольшее количество мутаций в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ. В анализируемой выборке больных кодоны 275, 155, 272 и 212 являлись «горячими точками» мутаций.

Анализ публикаций [44–46, 50], посвященных изучению последствий мутаций гена *TP53*, показывает, что каждая из них может иметь разнонаправленные эффекты на различные аспекты функционирования р53. Эти эффекты могут быть условно разделены на последствия для структурных характеристик белка, его биохимических свойств и биологической активности, а также в ряде случаев приводит к приобретению р53 новых функций, не свойственных белку нормального типа. Таким образом, каждая из мутантных форм белка является уникальным продуктом мутации и может сочетать в себе как усиление или снижение определенных видов активности р53, так и нарушение его структуры или приобретение белком новых свойств.

К появлению функционально неактивного белка р53 в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ приводили миссенс-

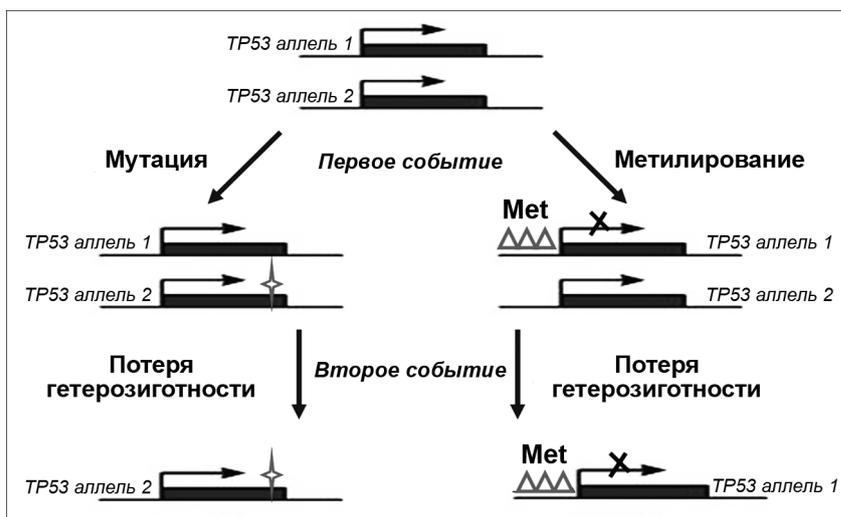


Рис. 4. Возможный двухударный механизм формирования дефицита функции гена *TP53* при диффузной В-ККЛ.

мутации р.L130F, р.T155I, р.R196Q, р.G244S, р.V272E и р.A276V наряду с мутацией р.A189Pfs, приводящей к сдвигу рамки считывания, нонсенс заменой р.R213X и сплайс-мутацией IVS6-36G>C. Все описанные выше события в кодирующей части гена приходятся на регионы, несущие информацию о высококонсервативных участках ДНК-связывающего домена белка, закрепленных эволюционно в филогенезе, и встречающихся в большинстве изоформ р53, а также структуре белков-гомологов р63 и р73.

Мутации р.R213X и р.G244S, а также р.V272E ранее уже были описаны при диффузной В-ККЛ [51, 52], а выявленная нами р.T155I ранее была зарегистрирована у нескольких больных ХЛЛ и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и низкой эффективностью его терапии [53]. Среди случаев с гемобластомами р.V272E ранее была описана при лимфоме Беркитта, болезни Ходжкина и В-клеточных НХЛ [25].

Все эти данные свидетельствуют о селекции р.L130F, р.T155I, р.R196Q, р.G244S, р.V272E, р.A276V, р.R213X и р.A189Pfs на этапах опухолевой прогрессии и не случайном их обнаружении у больных диффузной В-ККЛ.

По результатам анализа из выявленных в обследованной группе больных диффузной В-ККЛ лишь у 2 миссенс-замены (р.W146R и р.G293R) существенно не отражались на функции р53, а р.R156C приводил к появлению гиперактивного мутантного белка.

Из выявленных нами в группе больных диффузной В-ККЛ мутаций две могут влиять на сплайсинг молекулы РНК. К ним относятся сеймсенс-замена р.А307А и IVS6-36G>C. Функциональная значимость IVS6-36G>C была доказана в эксперименте *in vitro* [48]. Согласно прогнозу *TP53* Mutant assessor (release 1.00, 2012), р.А307А также находится в сайте сплайсинга молекулы РНК [47]. Несмотря на то что при сеймсенс-мутациях вновь образующийся кодон продолжает кодировать ту же аминокислоту, что обусловлено вырожденностью генетического кода, считается, что мутации данного типа могут менять сплайсинг, транскрипцию и стабильность РНК [24].

Функциональный эффект не затронутых в обсуждении интронных и сеймсенс-мутаций, выявленных в группе больных диффузной В-ККЛ, остается неизвестными. Вместе с тем они потенциально могут влиять не только на сплайсинг мРНК, но и на экспрессию гена, нарушая autoreгуляцию процессинга [28]. Также среди интронных мутаций следует отметить IVS4-30T>C ввиду того, что в 4-м интроне *TP53* расположен альтернативный промотор гена, участвующий в синтезе изоформ delta133 и delta160 р53 [49].

Имеющиеся в литературе единичные сообщения о низкой частоте метилирования промотора гена *TP53* при диффузной В-ККЛ [34] были проверены на исследуемой группе больных г. Новосибирска. Частота метилирования промотора гена *TP53* в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ составила 5,8% и значительно не различалась в подгруппах с мутантной (4,2%) и нормальной (6,7%) структурой гена, а также от данных К. Амага и соавт. (3,7%) [34].

Анализ ПГ в гене *TP53* был выполнен у 24 больных диффузной В-ККЛ группы исследования, из них 13 человек имели мутации, 11 – отсутствие изменений в последовательности гена *TP53*. По данным анализа микросателлитного маркера D17S796, расположенного рядом с *TP53*, выявлены 6 (25%) случаев ПГ, что соответствовало данным литературы [22].

При этом ПГ наблюдалась только в подгруппе больных с измененным статусом гена *TP53* (мутации – у 5 больных или метилирование промотора – у 1 больного), что составило 6 (42,9%) из 14 против 0% в группе из 10 больных с интактным геном ($p = 0,0223$).

Комплексный анализ изменчивости гена показывает, что недостаточность функции *TP53* при диффузной В-ККЛ может формироваться по двухударному принципу. Согласно ему, для перехода нормальной В-клетки в опухолевую при возникновении по меньшей мере части случаев диффузной В-ККЛ могут быть необходимы два последовательных события (рис. 4). Первое событие – это мутация или метилирование промотора *TP53*, приводящие к образованию клетки с повышенным риском злокачественной трансформации. Для реализации опухолевого потенциала в клетке должно случиться второе событие – потеря неповрежденного аллеля гена.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о селекции при диффузной В-ККЛ функционально значимых мутаций в участках гена *TP53*, кодирующих ДНК-связывающий регион.

Локализация «горячих точек» мутаций в отличие от спектра однонуклеотидных замен в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ отличается от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database.

Было показано наличие при диффузной В-ККЛ патогенетически значимых интронных и сеймсенс-замен, что свидетельствует о важности как анализа прилегающих к экзонам некодирующих участков гена, так и биоинформационного анализа выявленных синонимичных замен.

Комплексный анализ статуса *TP53* дает большее представление о возможных механизмах участия изменчивости данного гена в патогенезе диффузной В-ККЛ. Показано, что недостаточность функции *TP53* при диффузной В-ККЛ может формироваться по двухударному принципу.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (проект № НШ-10240.2016.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Kopnin B.P., Kopnin P.B., Khromova N.V., Agapova L.S. Multifaced p53: variety of forms, functions, tumor-suppressive and oncogenic activities. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2008; 1(1): 2–9.
- Глик Б., Пастернак Дж. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение.* Пер. с англ. М.: Мир; 2002.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stain H., et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon; 2008.
- Niroula R., Butera J. Genetics and diffuse large B-cell lymphoma. *R. I. Med. J.* 2015; 98(11): 23–6.
- Skibola C.F., Curry J.D., Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica.* 2007; 92(7): 960–9.
- Xu-Monette Z.Y., Medeiros L.J., Li Y., Orłowski R.Z., Andreeff M., Bueso-Ramos C.E., et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood.* 2012; 119(16): 3668–83. doi: 10.1182/blood-2011-11-366062.
- Hollstein M., Hainaut P. Massively regulated genes: the example of TP53. *J. Pathol.* 2010; 220(2): 164–17. doi: 10.1002/path.2637.
- Cheung K.J., Horsman D.E., Gascoyne R.D. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br. J. Haematol.* 2009; 146(3): 257–69. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07739.x.
- Gudkov A.V., Komarova E.A. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3(2): 117–29.
- Peller S., Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum. Mutat.* 2003; 21(3): 277–84.
- Kopnin B.P., Kopnin P.B., Khromova N.V., Agapova L.S. Multifaced p53: variety of forms, functions, tumor-suppressive and oncogenic activities. *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice. Russian Journal (Klinicheskaya onkogematologiya).* 2008; 1(1): 2–9. (in Engl.)
- Kitts A., Phan L., Ward M., Holmes J.B. The Database of Short Genetic Variation (dbSNP). The NCB Handbook. 2nd ed. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2013. (Last Update: April 3, 2014). [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TP53](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174586/11)
- Whibley C., Pharoah P.D., Hollstein M. P53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Rev. Cancer.* 2009; 9(2): 95–107.
- Voropaeva E.N., Voevoda M.I., Pospelova T.I., Maksimov V.N. Linkage disequilibrium and haplotypes of rs1042522, rs1625895 and rs17878362 gene TP53 markers in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Mol. Biol. (Mosk).* 2014; 48(5): 663–70.
- Voropaeva E.N., Voevoda M.I., Pospelova T.I., Maksimov V.N. Prognostic

- impact of the TP53 rs1625895 polymorphism in DLBCL patients. *Br. J. Haematol.* 2015; 169(1): 32–5.
- Lu J.T., Cen L., Zhou M. Prognostic value of P53 aberrations in diffuse large B-cell lymphoma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2012; 20(1): 100–2.
- Sun G.X., Cao X.S., Li Q., Wang Z.L. Correlation of BCL-6, MYC and p53 gene abnormalities with immunological subtypes and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2012; 29(5): 576–81.
- Gao P., Li Q., Wang Z., Yan F., Lu C., Cao X. Significance of BCL-6, MYC, P53 genes abnormalities for the prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2014; 31(5): 628–31. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.01.020.
- Stefancikova L., Moulis M., Fabian P., Vasova I., Zedek F., Ravcukova B., et al. Prognostic impact of p53 aberrations for R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Oncol.* 2011; 39(6): 1413–20.
- Stocklein H., Smardova J., Macak J., Katzenberger T., Holler S., Wessendorf S., et al. Detailed mapping of chromosome 17p deletions reveals HIC1 as a novel tumor suppressor gene candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene.* 2008; 27(18): 2613–25.
- Tamimi Y., Al-Harthy S., Al-Haddabi I., Al-Kindi M., Babiker H., Al-Moundhri M., Burney I. The p53 mutation/deletion profile in a small cohort of the Omani population with diffuse large B-cell lymphoma. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2014; 14(1): e50–8.
- Simonitsch-Klupp I., Hauser I., Ott G., Drach J., Ackermann J., Kaufmann J., et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic/plasmacytoid features are associated with TP53 deletions and poor clinical outcome. *Leukemia.* 2004; 18(1): 146–55.
- Xu-Monette Z.Y., Wu L., Visco C., Tai Y.C., Tzankov A., Liu W.M., et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood.* 2012; 120(19): 3986–96.
- Young K.H., Leroy K., Møller M.B., Colleoni G.W., Sánchez-Beato M., Kerbauy F.R., Haioun C., et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood.* 2008; 112(8): 3088–98.
- Edlund K., Larsson O., Ameur A., Bunikis I., Gyllenstein U., Leroy B., et al. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(24): 9551–6. doi: 10.1073/pnas.1207000109
- Frebourg T., Barbier N., Kassel J., Ng Y.S., Romero P., Friend S.H. A functional screen for germ line p53 mutations based on transcriptional activation. *Cancer Res.* 1992; 52(24): 6976–8.
- Tennis M., Krishnan S., Bonner M., Ambrosone C.B., Vena J.E., Moysich K., et al. p53 mutation analysis in breast tumors by a DNA microarray method. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006; 15(1): 80–5.
- Glick B.R., Pasternak J.J., eds. *Molecular biotechnology. Principles and applications of Recombinant DNA.* 2nd ed. Washington: ASM Press; 1994.
- Lehman T.A., Haffty B.G., Carbone C.J., Bishop L.R., Gumbs A.A., Krishnan S., et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(4): 1062–9.
- Agirre X., Novo F.J., Calasanz M.J., Larrayoz M.J., Lahortiga I., Valganon M., et al. TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Mol. Carcinog.* 2003; 38(4): 201–8.
- Pogribny I.P., James S.J. Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation. *Cancer Lett.* 2002; 176(2): 169–74.
- Kang J.H., Kim S.J., Noh D.Y., Park I.A., Choe K.J., Yoo O.J., Kang H.S. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab. Invest.* 2001; 81(4): 573–9.
- Garcia-Delgado M., Larrayoz M.J., Novo F.J. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene.* 2003; 22(7): 1070–2.
- Amara K., Trimeche M., Ziadi S., Laatri A., Hachana M., Sriha B., et al. Presence of simian virus 40 DNA sequences in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with aberrant promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes. *Int. J. Cancer.* 2007; 121(12): 2693–702.
- A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329(14): 987–94.
- http://p53.iarc.fr/download/tp53_directsequencing_iarc.pdf
- Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S. V., Hainaut P., et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 2007; 28(6): 622–9.
- Adzhubei I., Jordan D.M., Sunyaev S.R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2013; Ch.7: Unit 7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76.
- Almeida L.O., Custódio A.C., Pinto G.R., Santos M.J., Almeida J.R., Clara C.A., et al. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet. Mol. Res.* 2009; 8(1): 8–18.
- Grebe S.K., McIver B., Hay I.D., Wu P.S., Maciel L.M., Drabkin H.A., et al.

- Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 3p and 17p without VHL or p53 mutations suggests involvement of unidentified tumor suppressor genes in follicular thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82(11): 3684–91.
41. Shiraishi K., Kato S., Han S.Y., Liu W., Otsuka K., Sakayori M., et al. Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(1): 348–55.
 42. Monti P., Campomenosi P., Ciribilli Y., Iannone R., Inga A., Abbondandolo A., et al. Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene.* 2002; 21(11): 1641–8.
 43. Campomenosi P., Monti P., Aprile A., Abbondandolo A., Frebourg T., Gold B., et al. P53 mutants can often transactivate promoters containin gap21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene.* 2001; 20(27): 3573–9.
 44. Kakudo Y., Shibata H., Otsuka K., Kato S., Ishioka C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res.* 2005; 65(6): 2108–14.
 45. Monti P., Campomenosi P., Ciribilli Y., Iannone R., Aprile A., Inga A., et al. Characterization of the p53 mutants ability to inhibit p73 beta transactivation using a yeast-based functional assay. *Oncogene.* 2003; 22(34): 5252–60.
 46. Dearth L.R., Qian H., Wang T., Baroni T.E., Zeng J., Chen S.W., et al. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis.* 2007; 28(2): 289–98.
 47. Leroy B., Fournier J.L., Ishioka C., Monti P., Inga A., Fronza G., Soussi T. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (Database issue): D962–9. doi: 10.1093/nar/gks1033.
 48. Lehman T.A., Haffty B.G., Carbone C.J., Bishop L.R., Gumbs A.A., Krishnan S., et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(4): 1062–9.
 49. Bourdon J.C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2005; 19(18): 2122–37.
 50. Dekairle A.F., Tombal B., Cosyns J.P., Gala J.L. Assessment of the transcriptional activity of p53 improves the prediction of recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(13): 4724–32.
 51. Young K.H., Weisenburger D.D., Dave B.J., Smith L., Sanger W., Iqbal J., et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAIL receptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007; 110(13): 4396–405.
 52. Stefancikova L., Moulis M., Fabian P., Vasova I., Zedek F., Ravcukova B., et al. Prognostic impact of p53 aberrations for R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Oncol.* 2011; 39(6): 1413–20.
 53. Zenz T., Eichhorst B., Busch R., Denzel T., Habe S., Winkler D., et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(29): 4473–9.

Поступила 22.04.16

Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.419-036.11-092:575.174.015.3

Горбенко А.С.¹, Столяр М.А.^{1,3}, Субботина Т.Н.^{1,3}, Васильев Е.В.⁴, Ольховский И.А.^{1,2}

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ARG399GLN ГЕНА XRCC1 В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹Красноярский филиал ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия;²ФГБУН Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН, 660036, г. Красноярск, Россия;³ФГАОУ ВПО Сибирский федеральный университет, 660041, г. Красноярск, Россия;⁴КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, г. Красноярск, Россия

Для оценки ассоциации полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 с хроническими миелопролиферативными заболеваниями были обследованы 466 человек, в том числе: 79 больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), 91 – истинной полицитемией (ИП), 132 – эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ), 50 – миелофиброзом (МФ). Группу контроля составили 114 здоровых добровольцев. Показано, что распространенность минорного аллеля Gln в группе больных ХМЛ значимо выше (OR 1,53; 95% CI 0,67–3,51), особенно в группе больных с резистентностью к иматинибу (1,83; 95% CI 0,83–4,05), чем в группе контроля. Впервые выявлена взаимосвязь минорного полиморфизма исследуемого гена с ЭТ (OR 1,31; 95% CI 0,61–2,78), но не с ИП или МФ. Ассоциации полиморфных вариантов гена XRCC1 с уровнем аллельной нагрузки JAK2 не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о более важном значении продукта данного гена в контроле стабильности генома дифференцировки миелоидных клеток-предшественниц при ХМЛ и ЭТ. Исследование полиморфизма Arg399Gln в гене XRCC1 может быть полезно в комплексной оценке прогноза развития и эффективности лечения этих заболеваний.

Ключевые слова: XRCC1 Arg399Gln; хроническая миелоидная лейкемия; истинная полицитемия; эссенциальная тромбоцитемия.

Для цитирования: Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Васильев Е.В., Ольховский И.А. Роль полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 в патогенезе хронических миелопролиферативных заболеваний. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(3): 143-145. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-143-145

Gorbenko A.S.¹, Stolyar M.A.^{1,3}, Subbotina T.N.^{1,3}, Vasiliev E.V.⁴, Olkhovskiy I.A.^{1,2}

SIGNIFICANCE OF THE XRCC1 GENE ARG399GLN POLYMORPHISM IN THE PATHOGENESIS OF THE CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISEASES

¹Hematological Scientific Centre (Krasnoyarsk branch), Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation;²Krasnoyarsk Scientific Centre of the SB of RAS, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation;³Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation;⁴Krasnoyarsk Regional Hospital, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation;

We investigated the association between Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and chronic myeloproliferative diseases. 79 patients with chronic myeloid leukemia (CML), 91 patient with polycythemia vera (PV), 132 patients with essential thrombocythemia (ET). 50 patients with myelofibrosis and 114 controls were included in the study. We genotyped the polymorphism in XRCC1 gene by using polymerase chain reaction in real-time with TaqMan assay. The detection and quantification of the JAK2 gene V617F mutation allele burden was carried out by means of "Pyromark q24" pyrosequencing. The presence of at least one XRCC1 399Gln allele was found to be significantly different in patients with CML (OR 1.53; 95% CI 0.67–3.51) and ET (OR 1.31; 95% CI 0.61–2.78) in comparison with controls. The presence of XRCC1 399Gln allele was associated with the resistance to imatinib. We found no interactions between the XRCC1 genotype and the level JAK2

allelic burden. These data suggest about a significance of the *XRCC1* gene product in the control of precursor cells of the myeloid differentiation in CML and ET cells. Testing Arg399Gln polymorphism in *XRCC1* gene may be useful for the assessment of the prognosis and treatment efficacy.

Key words: *XRCC1* Arg399Gln; chronic myeloid leukaemia; polycythemia vera; essential thrombocythemia.

For citation: Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Vasiliev E.V., Olkhovskiy I.A. Significance of the *XRCC1* gene Arg399Gln polymorphism in the pathogenesis of the chronic myeloproliferative diseases. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(3): 143-145. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-143-145

Funding. The study was supported as part of the budget programs of Krasnoyarsk Scientific Center of the SB of RAS and Siberian Federal University, additional financing was supported by Krasnoyarsk Regional Association of Medical Laboratory Diagnostics.

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

Received 10 May 2016
Accepted 17 July 2016

Продукт экспрессии гена *XRCC1* (X-ray repair crosscomplementing group 1) входит в семейство белков, участвующих в контроле прохождения клеточного цикла и стабильности генома. Этот белок является важным регулятором системы эксцизионной репарации поврежденной ДНК, возникших в результате воздействия ионизирующей радиации и алкилирующих агентов [1]. Один из наиболее изученных полиморфизмов гена *XRCC1* располагается в кодоне 399, в сайте взаимодействия *XRCC1* с поли-(ADP-рибоза)-полимеразой. Однонуклеотидная замена G>A в этой области гена приводит к замене аргинина на глицин Arg>Gln с последующим конформационным изменением белка и снижением его активности. Установлено, что Gln-аллель увеличивает чувствительность к радиации, алкилирующим агентам и свободным радикалам кислорода [2]. В литературе имеется множество противоречивых данных об ассоциации носительства минорного Gln-аллеля с развитием опухолей различных локализаций. В систематических обзорах [3, 4] не удалось однозначно продемонстрировать существенное влияние данного полиморфизма на риск развития ряда злокачественных заболеваний, включая рак легкого, молочной железы, пищевода, мочевого пузыря, желудка и гепатоцеллюлярный рак. Ионизирующее облучение, курение, злоупотребление алкоголем, химические интоксикации, а также этнические особенности оказывают влияние на связь между носительством полиморфных аллелей гена *XRCC1* и развитием рака [5, 6].

Изучению роли полиморфизмов гена *XRCC1* в патогенезе злокачественных заболеваний кроветворных органов до 2015 г. было посвящено около 30 публикаций. Показано, что полиморфизм Arg399Gln увеличивает риск развития неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности [7], не оказывает существенного влияния [8] и даже снижает этот риск [9]. Предполагается определенная этиологическая роль аллельного варианта Gln в развитии хронического лимфолейкоза [10], а также его связь с неблагоприятным исходом заболевания [11]. Ранее полученные нами предварительные данные также свидетельствовали об ассоциации изучаемого полиморфизма с хроническими онкогематологическими заболеваниями [12].

Показано, что полиморфизм Arg399Gln *XRCC1* не влияет на риск развития первичного острого миелобластного лейкоза, но при этом предупреждает его развитие после химио- или радиотерапии солидных опухолей [13]. Не выявлено связи полиморфизма Arg399Gln *XRCC1* с риском развития хронического миелолейкоза (ХМЛ) [14], но вместе с тем получены данные о его влиянии на прогрессию этого заболевания [15]. Метаанализ опубликованных данных продемонстрировал наличие ассоциации полиморфизма Arg399Gln *XRCC1* с онкогематологическими заболеваниями в азиатской, но не в европейской популяции, одновременно данная ассоциация была статистически значимой для разных форм лейкемии, кроме лимфом и миеломы [16]. Негативное влияние мутации проявляется только при воздействии факторов, вызывающих повреждение ДНК, которые не удается компенсировать иными механизмами репарации.

Для корреспонденции:

Ольховский Игорь Алексеевич, кандидат мед. наук, доцент, директор Красноярского филиала ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, старший научный сотрудник ФГБУН «Красноярский научный центр» Сибирского отделения РАН. 660036, г. Красноярск, Россия. E-mail: krashemcenter@mail.ru.

For correspondence:

Olkhovskiy Igor A., MD, PhD, Associate professor, Director of Krasnoyarsk branch of Hematological Scientific Centre, senior researcher of the Krasnoyarsk Scientific Center, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation. E-mail: krashemcenter@mail.ru.

Information about authors:

Gorbenko A.S., <http://orcid.org/0000-0001-8756-2660>; Stolyar M.A., <http://orcid.org/0000-0002-8037-9844>; Subbotina T.N., <http://orcid.org/0000-0001-7790-5033>; Vasiliev E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3780-3758>; Olkhovskiy I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2311-2219>.

Данные об ассоциации полиморфизма Arg399Gln *XRCC1* с ХМЛ в российской популяции отсутствуют. Его возможная роль в патогенезе Ph-негативных хронических миелолипролиферативных заболеваний и взаимосвязь с уровнем аллельной нагрузки мутации V617F *JAK2* ранее не изучались.

Цель работы – исследовать возможную ассоциацию полиморфизма Arg399Gln в гене *XRCC1* при хронических миелолипролиферативных заболеваниях.

Материал и методы

В исследование включены данные обследования 352 больных, наблюдающихся в отделении гематологии Красноярской краевой клинической больницы, а также 114 клинически здоровых добровольцев, составивших группу контроля. Пол, возраст и диагноз участников исследования в сравниваемых группах представлены в табл. 1. Диагноз устанавливали в соответствии с клиническими рекомендациями ВОЗ (2008). В исследование включены 79 больных ХМЛ, 91 больной истинной полицитемией (ИП), из них 79 имели мутацию V617F в гене *JAK2* (rs77375493), 1 – мутацию N542-E543 del в области экзона 12 этого гена. Диагноз эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) на момент обследования имели 132 пациента, из них 75 с мутацией V617F в гене *JAK2*, 31 – в гене кальретикулина (*CALR*), 6 – в гене рецептора тромбопоэтина (*MPL*). На момент исследования 50 больных имели различную степень выраженности миелофиброза (МФ).

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили методом осаждения на сорбенте (набор ДНК-сорб-В, «ИнтерЛаб-Сервис», Россия). Концентрацию ДНК измеряли с помощью набора dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit («Invitrogen», США) и готовили разведения ДНК в ТЕ-буфере до необходимой для проведения каждой методики концентрации. Выявление и количественный анализ мутации V617F в гене *JAK2* проводили с помощью набора реагентов АмплиСенс® Пироскрин, Тромбо-скрин (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии») на приборе PyroMark Q24 («Qiagen», Германия).

Выявление полиморфизма Arg399Gln в гене *XRCC1* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием системы TaqMan Assay и двух пар олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участку гена *XRCC1* (F: GTA-AGG-AGT-GGG-TGC-TGG-ACT-GT; R: GTC-TGA-CTC-CCC-TCC-AGA-TTC-C) и двух зондов (A-аллель: FAM-CTG-CCC-TCC-CAG-AGG-TAA-GGC-CTC-BHQ1; G-аллель: HEX-CTG-CCC-TCC-CGG-AGG-TAA-GGC-C-BHQ1) на приборе iQ iCyler 5.0.

Статистическую обработку результатов распределения частот полиморфных вариантов гена *XRCC1* среди сравниваемых групп проводили методом χ^2 в соответствии с аддитивной моделью с помощью веб-приложения «Генетический калькулятор» на сайте ООО «ГенЭксперт» (http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php).

Таблица 1

Характеристика пациентов и распространенность полиморфных вариантов Arg399Gln в гене *XRCC1* при хронических миелолипролиферативных заболеваниях

Показатель	Группа контроля	Больные			
		ХМЛ	ИП	ЭТ	МФ
Число больных:	114	79	91	132	50
мужчин	72	51	45	84	31
женщин	42	28	46	48	19
Возраст, годы: Me (C ₂₅ -C ₇₅)	21 (19-41)	59 (45-67)	60 (51-65)	61 (49-72)	62 (54-67)
Arg/Arg, %	47,4	31,7	45,1	33,3	44
Arg/Gln, %	41,2	51,9	47,3	52,3	48
Gln/Gln, %	11,4	16,5	7,7	14,4	8
Аллель Arg, %	68	57,6	70,9	59,4	68
Аллель Gln, %	32	42,4	29,1	40,6	32

Таблица 2

Результаты сравнительного распределения исследуемых генотипов гена *XRCC1* среди групп пациентов в соответствии с аддитивной моделью (OR; 95% CI)

Группы сравнения	Генотип			<i>p</i>
	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
Контроль – ХМЛ	0,51 (0,28–0,94)	1,54 (0,86–2,74)	1,53 (0,67–3,51)	< 0,04
Контроль – ХМЛ резистентные к иматинибу	0,37 (0,15–0,89)	1,83 (0,83–4,05)	1,79 (0,62–5,17)	< 0,03
Контроль – ЭТ	0,56 (0,33–0,93)	1,56 (0,94–2,59)	1,31 (0,61–2,78)	< 0,05
ИП – ЭТ	0,5 (0,2–1,23)	0,82 (0,48–1,40)	1,64 (0,95–2,84)	< 0,04

Результаты

Полученные результаты представлены в табл. 1–3. Распределение частот полиморфных вариантов Arg399Gln в гене *XRCC1* среди контрольной группы соответствует закону независимого распределения Харди–Вейнберга и средним значениям по распространенности изучаемого полиморфизма данного гена в европейской популяции [2, 3].

Полученные данные свидетельствуют о более высокой частоте встречаемости минорного аллеля исследуемого гена как у больных ХМЛ, так и у больных ЭТ (см. табл. 2). Максимальная частота носительства аллеля Gln наблюдалась у пациентов с резистентной к ингибиторам тирозинкиназы формой ХМЛ, что согласуется с данными [15]. Больные МФ по распределению исследуемых полиморфизмов значительно не различались от группы здоровых лиц и от больных ИП.

Обсуждение

Пониженная способность к репарации разрывов ДНК у носителей минорного аллеля Gln399 гена *XRCC1* в большей мере способствует возникновению соматических мутаций и формированию Рн-хромосомы. Одновременно этот вариант полиморфизма способствует большей нестабильности генома клеток ХМЛ и их эволюции в резистентную к терапии форму.

Полученные данные могут быть объяснены также разным функциональным вкладом активности продукта гена *XRCC1* на разных этапах дифференцировки клеток костного мозга. Наблюдаемые значимые отличия в частоте встречаемости минорного аллеля исследуемого генетического полиморфизма между больными ХМЛ и ЭТ, с одной стороны, и больными ИП – с другой, очевидно, отражают различную вовлеченность гена *XRCC1* в контроль восстановления поврежденных ДНК клеток-предшественниц гранулоцитарного мегакариоцитарного ряда и эритроидного ростка костного мозга. Вероятно, в клетках-предшественницах трансформированного клона при ИП ген *XRCC1* не лимитирует процесс репарации ДНК.

В нашей выборке не выявлено существенных различий в уровне аллельной нагрузки мутации V617F *JAK2* среди пациентов с разными генотипами в области исследуемого полиморфизма Arg399Gln гена *XRCC1* при Рн-негативных хронических миелоидных неоплазмах (см. табл. 3).

Отсутствие зависимости уровня аллельной нагрузки мутации V617F *JAK2* от полиморфных вариантов Arg399Gln *XRCC1* противоречит гипотезе о влиянии данного полиморфизма на процесс потери гетерозиготности соматической мутации V617F *JAK2*, характерной для развития ИП, но не ЭТ.

Отсутствие ассоциации полиморфизма Arg399Gln *XRCC1* с хронической фазой ХМЛ, полученное авторами в исследованиях у 182 больных ХМЛ турецкой популяции [14], может объясняться различиями в национальности, условиях и образе жизни включенных в исследование пациентов. Проживание в зонах повышенного радиационного фона, курение, бытовые и производственные интоксикации, более характерные для населения промышленных сибирских регионов, могут выступать факторами, дополнительно провоцирующими усиленную нагрузку на ферментативные системы репарации ДНК, повышающие в том числе вероятность развития ХМЛ и ЭТ у наших пациентов с ослабленным полиморфным вариантом гена *XRCC1*.

Таким образом, обнаруженные различия частот встречаемости различных генотипов полиморфизма Arg399Gln в гене *XRCC1* при ХМЛ, ЭТ и ИП свидетельствуют о специфическом значении продукта данного гена в контроле дифференцировки клеток-предшественниц гранулоцитарного, мегакариоцитарного и эритроидного ростков. Определение полиморфизма Arg399Gln в гене *XRCC1*

Таблица 3

Аллельная нагрузка мутации V617F *JAK2* у пациентов с разными вариантами генотипов в области полиморфизма Arg399Gln гена *XRCC1*; Me ($C_{25}-C_{75}$), %

Генотип <i>XRCC1</i>	Все пациенты с мутацией V617F <i>JAK2</i>	В том числе больные		
		ИП	ЭТ	МФ
Arg/Arg	45,5 (26–66,3)	52 (29,9–66,3)	28,5 (16,9–45,5)	79,3 (42,9–91)
Arg/Gln	41,6 (22,8–62,4)	51,9 (35,8–75,7)	28 (17,2–46,8)	63,4 (47,5–97,5)
Gln/Gln	44,2 (31,3–50,7)	42,9 (28,7–52)	42,9 (34,8–47,8)	46 (28,2–70,5)

может быть полезно в комплексной оценке риска и прогноза развития ХМЛ и ЭТ. Вместе с тем молекулярные механизмы обнаруженного феномена требуют дальнейшего изучения.

Финансирование. Настоящее исследование проведено в рамках бюджетных программ НИР ФГБУН КНЦ СО РАН и СФУ. Дополнительная частичная финансовая поддержка была получена от региональной общественной организации РОО «Красноярская краевая ассоциация медицинских лабораторий диагностики».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И. Ассоциация полиморфизма Arg399Gln гена репарации ДНК *XRCC1* с риском развития неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности. *Гематология и трансфузиология*. 2013; 58(1): 10–4.
- Горбенко А.С., Бахтина В.И., Шевчук Д.В., Васильев Е.В., Москов В.И., Виноградова Е.Ю. и др. Исследование полиморфизма гена Arg399Gln *XRCC1* у пациентов с хроническим лимфолейкозом. *Сборник тезисов 8-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014»*. 2014; Т.2: 92.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Thompson L.H., Brookman K.W., Jones N.J., Allen S.A., Carrano A.V. Molecular cloning of the human *XRCC1* gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.* 1990; 10(12): 6160–71.
- Hu J.J., Smith T.R., Miller M.S., Lohman K., Case L.D. Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Environ. Mol. Mutagen.* 2002; 39(2–3): 208–15.
- Hu Z., Ma H., Chen F., Wei Q., Shen H. *XRCC1* polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14(7): 1810–8.
- Huang G., Cai S., Wang W., Zhang Q., Liu A. Association between *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms with lung cancer risk: a meta-analysis from case-control studies. *PLoS One*. 2013; 8(8): e68457. doi: 10.1371/journal.pone.0068457.
- Hong Y.C., Lee K.H., Kim W.C., Choi S.K., Woo Z.H., Shin S.K., et al. Polymorphisms of *XRCC1* gene, alcohol consumption and colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 2005; 116(3): 428–32.
- Hung R.J., Hall J., Brennan P., Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 2005; 162(10): 925–42.
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I. Association of Polymorphism Arg399Gln *XRCC1* DNA repair gene with the risk of high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2013; 58(1): 10–4. (in Russian).
- Matsuo K., Hamajima N., Suzuki R., Andoh M., Nakamura S., Seto M., et al. Lack of association between DNA base excision repair gene *XRCC1* Gln399Arg polymorphism and risk of malignant lymphoma in Japan. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2004; 149(1): 77–80.
- Kim H.N., Kim N.Y., Yu L., Kim Y.K., Lee I.K., Yang D.H., et al. Polymorphisms in DNA repair genes and MDR1 and the risk for non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(4): 6703–16. doi:10.3390/ijms15046703.
- Duman N., Aktan M., Ozturk S., Palanduz S., Cakiris A., Ustek D., et al. Investigation of Arg399Gln and Arg194Trp polymorphisms of the *XRCC1* (x-ray cross-complementing group 1) gene and its correlation to sister chromatid exchange frequency in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2012; 16(4): 287–91. doi: 10.1089/gtmb.2011.0152.
- Ganster C., Neesen J., Zehetmayer S., Jäger U., Esterbauer H., Mannhalter C., et al. DNA repair polymorphisms associated with cytogenetic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009; 48(9): 760–7. doi: 10.1002/gcc.20680.
- Gorbenko A.S., Bakhtina V.I., Shevchuk D.V., Vasiliev E.V., Moskov V.I., Vиноградова Е.Ю. Investigation of gene polymorphism Arg399Gln *XRCC1* in patients with chronic lymphocytic leukemia. Abstracts of the 8th all-Russian scientific-practical conference with international participation “Molecular diagnosis of 2014”. 2014; vol. 2: 92. (in Russian)
- Seedhouse C., Bainton R., Lewis M., Harding A., Russell N., Das-Gupta E. The genotype distribution of the *XRCC1* gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 2002; 100(10): 3761–66.
- Deligezer U., Akisik E.E., Dalay N. Lack of Association of *XRCC1* codon 399Gln polymorphism with chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Res.* 2007; 27(4B): 2453–6.
- Annamaneni S., Gorre M., Kagita S., Addepalli K., Digumarti R.R., Satti V., et al. Association of *XRCC1* gene polymorphisms with chronic myeloid leukemia in the population of Andhra Pradesh, India. *Hematology*. 2013; 18(3): 163–8.
- Du L., Liu Y., Xue P., Song C., Shen J., He Q., et al. The Arg399Gln polymorphism in the *XRCC1* gene is associated with increased risk of hematological malignancies. *Tumour Biol.* 2015; 36(6): 4545–54. doi: 10.1007/s13277-015-3099-6.

Поступила 10.05.16

Принята к печати 17.07.16

Танашян М.М.¹, Кузнецова П.И.¹, Суборцева И.Н.², Шабалина А.А.¹, Лагода О.В.¹, Меликян А.Л.²

ХРОНИЧЕСКАЯ И ОСТРАЯ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНАЯ ПАТОЛОГИЯ ПРИ Ph-НЕГАТИВНЫХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии», 125367, г. Москва, Россия;

²ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Представлены результаты совместного исследования, посвященного оценке проявлений цереброваскулярной патологии на фоне миелопролиферативных заболеваний (МПЗ). Нарушения микроциркуляторного русла играют весомую роль в развитии и прогрессировании острых и хронических цереброваскулярных заболеваний и могут быть связаны с различными отклонениями в гемограмме. Одним из самых частых клинических проявлений МПЗ является головная боль, зачастую предшествующая постановке гематологического диагноза. В большинстве случаев головная боль ассоциирована с очаговыми изменениями сосудистого генеза по данным магнитно-резонансной томографии. Особенности течения острого нарушения мозгового кровообращения на фоне тромботической окклюзии магистральных артерий головы является их флюктуирующее течение, связанное с динамикой нарастания тромбоза. Снижение эластичности сосудистой стенки и уменьшение ее атромбогенного потенциала может приводить к расстройству компенсаторных механизмов функциональной активности эндотелия и реализации инсульта.

Ключевые слова: цереброваскулярные болезни; инсульт; гемореологическая микроокклюзия; миелопролиферативные заболевания; тромбоз; сосудистая стенка; головная боль; атромбогенный потенциал эндотелия; инсульт в молодом возрасте; деформируемость эритроцитов; микроциркуляторное русло.

Для цитирования: Танашян М.М., Кузнецова П.И., Суборцева И.Н., Шабалина А.А., Лагода О.В., Меликян А.Л. Хроническая и острая цереброваскулярная патология при Ph-негативных миелопролиферативных заболеваниях. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 146-150. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-146-150

Tanashyan M.M.¹, Kuznetsova P.I.¹, Subortseva I.N.², Shabalina A.A.¹, Lagoda O.V.¹, Melikyan A.L.²

CHRONIC AND ACUTE CEREBROVASCULAR PATHOLOGY IN PATIENTS WITH Ph-NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE DISEASES

¹Research Center of Neurology, Moscow, 125367, Russian Federation;

²National Research Center of Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

Disturbances of microcirculation play a significant role in the development and progression of acute and chronic cerebrovascular diseases (CVD). One of the reasons of prothrombotic state of the endothelium is the increase of the number of blood corpuscles leading to myeloproliferative disorders (non-Ph) (MPD). Headache was one of the most prominent clinical symptoms of CVD. It is often preceded the hematological diagnosis. Often headache is associated with focal vascular lesions on the magnetic resonance imaging. Acute cerebral events occurring as a result of thrombotic occlusion of the one or several carotid arteries tend to exhibit a fluctuating clinical course – the latter being closely linked to the dynamics of thrombus progression. Our data suggest that the decrease in vascular wall elasticity and its athrombotic properties may lead to a pathologic change in endothelial function – consequently leading to stroke. An important clinical feature of the mentioned CVD is the young age of patients – this underlines the necessity of hematological tests in cases with cryptogenic stroke.

Key words: cerebrovascular diseases; stroke; hemorheological microocclusion; myeloproliferative diseases; thrombosis; vascular wall; headache; athrombotic properties of endothelium; young stroke; red blood cell deformability; microcirculatory disturbances.

For citation: Tanashyan M.M., Kuznetsova P.I., Subortseva I.N., Shabalina A.A., Lagoda O.V., Melikyan A.L. Chronic and acute cerebrovascular pathology in patients with Ph-negative myeloproliferative diseases. *Hematology and Transfusiology*. Russian journal (*Gematologiya i transfuziologiya*). 2016; 61(3): 146-150. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-146-150

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 18 May 2016

Accepted 17 July 2016

Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) являются глобальной проблемой современного здравоохранения. По данным исследователей Вашингтонского университета, доля летальных исходов при острых (ОНМК) и хронических нарушениях мозгового кровообра-

щения (ХНМК) составляет до 11% [1], что делает эту патологию второй по распространенности причиной смерти в мире [2]. Наряду с медицинской значимостью высокой социальной звучание обуславливает повышенный интерес к изучению различных аспектов развития и прогрессирования сосудистой патологии головного мозга.

Нарушение реологических свойств крови – одна из основных причин, приводящих к развитию хронической или острой церебральной ишемии [3]. Гиперкоагуляция, повреждение сосудистой стенки (эндотелия) и нарушение кровотока (турбулентность, стаз) могут наблюдаться при миелопролиферативных заболеваниях (МПЗ). Группа классических Ph-негативных МПЗ объединяет истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), первичный миелофиброз (ПМФ). Заболеваемость ИП составляет 0,4–2,8, ЭТ – 0,38–1,7, ПМФ – 0,1–1 случай на 100 000 населения в год. Таким образом, заболевания этой группы отнесены к орфанным [4]. Смертность в результате острых церебральных событий среди больных МПЗ в 1,5 раза выше, чем в популяции [5–7].

Для корреспонденции:

Кузнецова Полина Игоревна, аспирант 1-го неврологического отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии», 125367, г. Москва, Россия. E-mail: angioneurology0@gmail.com.

For correspondence:

Kuznetsova Polina I., MD, postgraduate student of the Neurological department of the Research Center of Neurology, Moscow, 125367, Russian Federation. E-mail: angionerology0@gmail.com.

Information about authors:

Tanashyan M.M., <http://orcid.org/0000-0002-5883-8119>; Kuznetsova P.I., <http://orcid.org/0000-0002-4626-6520>; Subortseva I.N., <http://orcid.org/0000-0001-9045-8653>; Shabalina A.A., <http://orcid.org/0000-0001-9604-7775>; Lagoda O.V., <http://orcid.org/0000-0001-7562-4991>; Melikyan A.L., <http://orcid.org/0000-0002-2119-3775>.

МПЗ характеризуются пролиферацией одной или более клональной линии миелопоэза в костном мозге с признаками сохранной терминальной дифференцировки и сопровождаются изменениями показателей клинического анализа крови и соответствующей клинической картиной. Патогенез МПЗ представляет сложный много-ступенчатый процесс, первичным событием при этом является появление патологического клона. Важную роль играют генетические перестройки. В 2005 г. открыта мутация V617F гена *JAK2*. Данная мутация встречается у 96–98% больных ИП, у 55% – ЭТ, у 45–68% – ПМФ. В настоящее время известны мутации других генов (*MPL*, *CSLR* и др.) [8]. Клинические проявления заболевания тесно связаны с его патогенезом. Основным проявлением МПЗ является повышение риска развития тромботических осложнений.

Одним из наиболее угрожающих для жизни пациента состоянием является тромбоз одной из магистральных артерий головы с развитием полушарного инфаркта с большим объемом поражения вещества головного мозга [9].

Необходимо отметить важную роль генетических факторов в формировании тромбозов. Согласно исследованиям [10], наличие мутации V612F в гене *JAK2* у больных МПЗ увеличивает риск возникновения тромботических осложнений. Экспрессия мутации более 75% была ассоциирована с более высоким риском возникновения кардио- и цереброваскулярных осложнений по сравнению с больными, у которых экспрессия мутаций ниже 25%. По данным литературы [11, 12], у больных ЭТ и ПМФ наличие мутации *JAK2V617F* увеличивает риск возникновения (артериальных и венозных) тромбозов в 2 раза, однако данные требуют дальнейшего исследования.

Возникновение тромбоза и как следствие ОНМК/ХНМК при МПЗ всегда является результатом взаимодействия изменений, обусловленных заболеванием и множественными факторами риска тромбозов.

Цель исследования – выявление клинико-лабораторных особенностей течения цереброваскулярной патологии, а также выявление факторов риска развития макротромбозов в артериальной сети у больных МПЗ.

Материал и методы

В исследование были включены 167 больных, из них 102 больных МПЗ (основная группа) и 65 пациентов с цереброваскулярными заболеваниями без МПЗ (группа сравнения). Больные наблюдались в ФГБНУ «Научный центр неврологии» и ФГБУ «Гематологический научный центр» с ноября 2013 по март 2016 г.

В зависимости от подтипа МПЗ (согласно критериям ВОЗ, 2008) основную группу составили 38 (37%) больных ЭТ, 41 (40%) – ИП, 23 (23%) – ПМФ. Соотношение мужчин и женщин 1:3. Средний возраст обследованных больных – 44,6 года, от 20 до 58 лет [межквартильный интервал 35–58,5]. Мужчины: медиана возраста 53 года [межквартильный интервал 32–56]. Женщины: медиана возраста 45,5 года [межквартильный интервал 20–57]. Критериями включения в исследование являлось наличие верифицированного диагноза МПЗ, возраст больного от 20 до 58 лет, согласие на исследование. Критериями исключения для больных МПЗ являлись: сопутствующая кардиальная патология (нарушение ритма, изменения клапанов сердца), артериальная гипертензия, атеросклеротическое поражение магистральных артерий головы, прием оральных контрацептивов в анамнезе женщин, отказ от участия в исследовании. Для группы сравнения критериями включения являлись наличие цереброваскулярного заболевания (на фоне сосудистого анамнеза), возраст пациентов до 58 лет, согласие на исследование, критериями исключения – возраст пациентов старше 58 лет, отказ от исследования.

Наряду с общеклиническим и неврологическим обследованием проводили:

- Нейровизуализационное исследование (магнитно-резонансная томография – МРТ) вещества головного мозга, сосудов головного мозга (артериальных и венозных) на интракраниальном уровне проводили на томографе Magnetom Verio (“Siemens”, Германия) с величиной магнитной индукции 3 Тл.

- Цветовое дуплексное сканирование сонных артерий. Исследовали: толщину комплекса интима-медиа (КИМ) в общих сонных артериях и в области бифуркации; сосудодвигательную функцию эндотелия исследовали с помощью ультразвуковой «манжеточной пробы» с исследованием поток-зависимой вазодилатации (ПЗВД) плечевой артерии по методике D. Celermajer [13] на приборе Toshiba Viamo (Япония) с целью выявления эндотелиальной дисфункции. За нормальную функцию эндотелия считали величину расширения артерии от исходного диаметра выше 10%; вазодилатацию менее 10% расценивали как патологическую.

- Исследование следующих показателей систем гемореологии и гемостаза: фибриноген по Clauss [14]; антитромбин III (АТIII), фактор Виллебранда – ФВ (иммунотурбодиметрическим латексным методом) на автоматическом коагулометре ACL 9000; общую фибринолитическую активность (ФА) с расчетом индекса фибринолиза (ИФ). Агрегацию тромбоцитов определяли турбодиметрическим методом на лазерном агрегометре Biola Ltd. (Россия) с индукторами: аденозиндифосфат (АТ-АДФ) и адреналин (АТ-Адр).

Таблица 1

Распределение пациентов с головной болью в основной группе в зависимости от подтипа МПЗ и ассоциация ее с очаговыми изменениями на МРТ головного мозга

МПЗ	Число больных	Головная боль		Очаговые изменения на МРТ (головная боль + очаговые изменения)	
		абс.	%	абс.	%
Истинная полицитемия	41	29	71	25	86
Эссенциальная тромбоцитемия	38	30	79	20	67
Первичный миелофиброз	23	20	86	18	90

Исследование реологических характеристик эритроцитов: агрегация эритроцитов (АЭ), скорость полной дезагрегации (γ -dis) и деформируемость эритроцитов (D_{max}), амплитуда агрегации (размер агрегатов), время образования монетных столбиков (Tf), время образования трехмерных агрегатов (Ts), индекс агрегации эритроцитов (AI) определяли на лазерном оптическом ротационном клеточном анализаторе LORRCA (Нидерланды).

Проводили оценку атромбогенного потенциала сосудистой стенки (ее антиагрегационную, антикоагулянтную и фибринолитическую активность). Для этого была использована биохимическая манжеточная проба (МП), которая основана на создании кратковременной (3–5 мин) локальной ишемии руки путем компрессии плеча испытуемого манжетой сфигмоманометра и созданием в ней давления, превышающего систолическое на 10 мм рт. ст. С помощью МП у всех больных оценивали активность сосудистой стенки, которую определяли как разницу показателей гемореологии и гемостаза до и после МП, выраженную в процентах относительно исходных показателей.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и Statistica (версия 10.0). В работе использовали следующие методы непараметрической статистики: сравнение двух групп по критерию Манна–Уитни, метод корреляционного анализа с применением коэффициента Спирмена, описательную статистику (оценка средних значений, медианы, доверительного интервала).

Результаты

Наиболее частыми клиническими неврологическими проявлениями в группе больных МПЗ были: головная боль – у 81 (79%), вестибулярные расстройства – у 79 (82%), двигательные расстройства – у 18 (17%), чувствительные нарушения – 18 (17%).

У 29 (34%) обследованных больных обнаруживали симптомокомплекс, соответствующий начальным проявлениям недостаточности мозгового кровообращения, с жалобами на головную боль, головокружение, пониженный фон настроения, развитие синдрома хронической усталости в сочетании с отсутствием очаговых изменений вещества головного мозга по данным МРТ. При рассмотрении цефалгического синдрома выявлено, что в 86% случаев он был ассоциирован с ПМФ, при этом у пациентов с ИП и ЭТ распространенность головной боли была сопоставимой (70%) (табл. 1). При оценке по половому признаку значимых различий не выявлено.

У 52 (50%) пациентов наблюдалась клиническая картина дисциркуляторной энцефалопатии наряду с цефалгическим синдромом, вестибулярными нарушениями и чувствительными расстройствами. Необходимо отметить, что основанием для установления диагноза дисциркуляторной энцефалопатии помимо клинической картины являлось также наличие очаговых изменений сосудистого генеза. По данным МРТ головного мозга, последние были локализованы в субкортикальной зоне лобных и теменных долей. Следует отметить, что они не наблюдались в глубоких отделах вещества мозга, вероятно, в связи с тем, что критериями исключения у нашей группы пациентов являлось наличие «сосудистого» (артериальной гипертензии, нарушения ритма сердца, атеросклеротического поражения магистральных артерий головы) анамнеза.

В основной группе 21 (21%) больной перенес ОНМК. Среди пациентов с инсультом 8 перенесли полушарные инфаркты на фоне тромботической окклюзии одной из магистральных артерий головы (рис. 1). У всех больных на фоне лечения отмечались признаки полной реканализации тромба с восстановлением кровотока (рис. 2), 13 пациентов перенесли инфаркты корковой локализации небольшого размера в зонах смежного кровоснабжения (вероятно, по типу гемореологической микроокклюзии).

По данным ультразвукового исследования у 65 (67%) пациентов каких-либо структурных изменений в системе брахиоцефальных артерий не выявлено, у 29 (28%) выявлено утолщение комплекса интима-медиа общих сонных артерий, у 8 (8%) – тромботическая

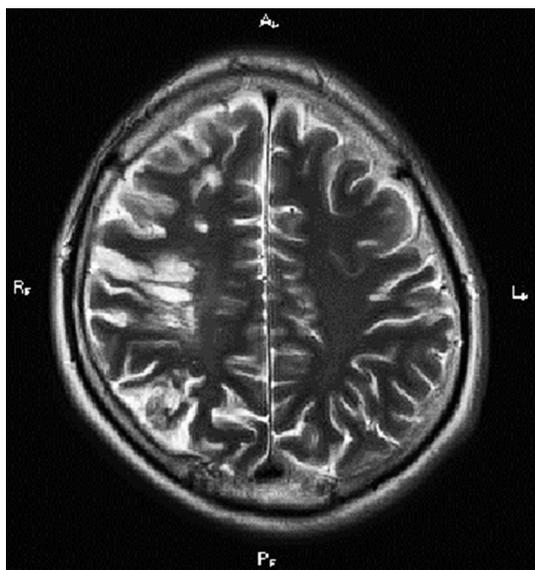


Рис. 1. Больной Р., 52 года. Обширный инфаркт в правом полушарии головного мозга на фоне тромботической окклюзии внутренней сонной артерии (в 1-е сутки).

окклюзия внутренних сонных артерий без признаков атеросклеротического поражения.

Наименьшая степень вазодилатирующей активности была характерна для больных МПЗ перенесших инсульт ($p = 0,011$), что свидетельствует о выраженной дисфункции эндотелия. Различия в ПЗВД по подтипам МПЗ: при эссенциальной тромбоцитемии медиана значения 9,1 [межквартильный интервал 4–14], при истинной полицитемии – 7 [межквартильный интервал 4–10], первичном миелофиброзе – 7 [межквартильный интервал 7–14] (табл. 2). Таким образом, статистически значимых различий не выявлено при сравнении результатов ПЗВД между вариантами МПЗ.

С целью оценки влияния МПЗ на течение цереброваскулярной патологии больных распределили на две подгруппы: 1-ю группу составили больные МПЗ, а 2-ю группу (контроля) – пациенты с классической сосудистой патологией (артериальной гипертензией, атеросклерозом магистральных артерий головы), но без МПЗ.

При анализе результатов в группе больных МПЗ с ОНМК выявлена более низкая степень ответа на поток-зависимую вазодилатацию, чем у пациентов с ОНМК без МПЗ, что может свидетельствовать о выраженном повреждении эндотелия, возможно, связанном с более активным патологическим взаимодействием тромбоцитов и сосудистой стенки при МПЗ (см. табл. 2).

При исследовании показателей гемореологии, гемостаза статистически значимых различий у пациентов с различными вариантами МПЗ не выявлено, что позволило их объединить в общую группу. При сопоставлении группы больных МПЗ и группы сравнения (пациентов с цереброваскулярными заболеваниями без сопутствующего гематологического заболевания) были получены результаты, представленные в табл. 3.

Агрегация тромбоцитов под влиянием АДФ и адреналина была статистически значимо снижена у больных с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) на фоне МПЗ по сравнению с больными с инсультом без МПЗ. Также при хроническом течении цереброваскулярной патологии при МПЗ статистически значимо снижены показатели агрегации тромбоцитов по сравнению с таковыми у пациентов с хронической цереброваскулярной патологией (ХЦВП) без МПЗ.

Показатели деформируемости эритроцитов у больных с сосудистой патологией (как острой, так и хронической) при МПЗ статистически значимо различаются не только от нормы, но и от группы сравнения (пациентов с ЦВЗ без МПЗ). Снижение деформируемости эритроцитов говорит о начальном этапе нарушений на уровне микроциркуляторного русла. Показатели амплитуды агрегации (размер агрегатов) выше в группе пациентов с цереброваскулярной патологией на фоне МПЗ по сравнению с пациентами с цереброваскулярной патологией (ЦВП) без МПЗ. Время образования трехмерных агрегатов статистически значимо выше в группе ЦВП при МПЗ, чем в группе без МПЗ. Прочность агрегатов статистически значимо выше в группе с ОНМК при МПЗ, чем в группе пациентов с острым инсультом без МПЗ. Статистически значимых различий в показателях фактора Виллебранда, фибриногена и антитромбина III между

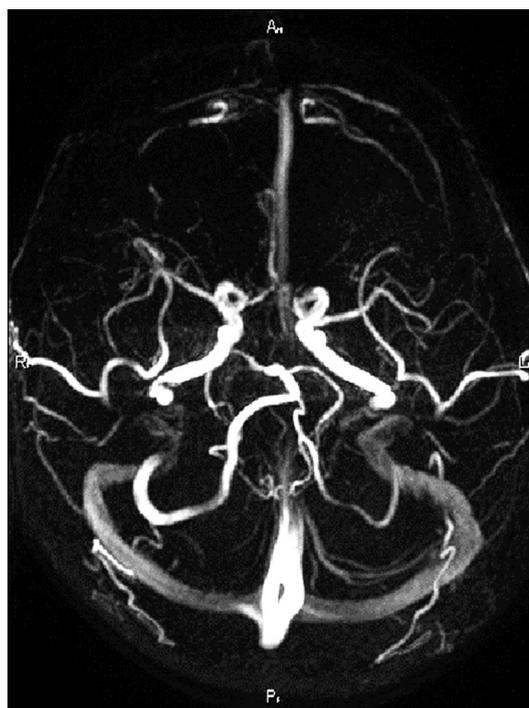


Рис. 2. Больной Р., 52 года. Магнитно-резонансная ангиография. Восстановление кровотока по средней мозговой артерии на фоне полушарного инфаркта (через 2 дня после развития острого нарушения мозгового кровообращения).

группами с ЦВП на фоне МПЗ и ЦВП без МПЗ не было. Показатели гематокрита статистически значимо выше в группе пациентов с ОНМК при МПЗ. Показатели фибринолитической активности и индекса фибринолиза снижены по сравнению с нормой, но не различаются между группами.

По результатам МП получены статистически значимые данные о снижении атромбогенного потенциала сосудистой стенки у больных МПЗ по сравнению с пациентами без МПЗ с наличием как острой, так и хронической цереброваскулярной патологии. Атромбогенный потенциал снижен за счет антиагрегационной и фибринолитической составляющей при относительно сохранной антикоагуляционной составляющей (в ответ на МП показатели АТIII существенно не меняются). Снижение антиагрегационной и фибринолитической активности выражается в недостаточном ответе на локальную ишемию показателей АТ-АДФ и АТ-адреналина (антиагрегационная составляющая) и ФА и ИФ (фибринолитическая составляющая). В норме при МП фактор Виллебранда снижается, а в нашем исследовании получены статистически значимые данные об увеличении показателя фактора Виллебранда в ответ на ишемию, особенно в группе с ОНМК при МПЗ, что говорит о патологическом ответе сосудистой стенки в ответ на ишемию и недостаточные компенсаторные возможности эндотелия. Таким образом, можно сказать, что инсульт

Таблица 2

Результаты УЗИ пациентов с цереброваскулярной патологией (ЦВП) на фоне МПЗ и без сопутствующего МПЗ

Показатель	ОНМК (с МПЗ) n = 17		ОНМК (без МПЗ) n = 30		ХЦВП (с МПЗ) n = 79		ХЦВП (без МПЗ) n = 35	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Атеросклеротическое поражение МАГ (до 20%)	0	0	25	35	4	5	29	83
Утолщение КИМ	2	12	5	53	28	35	6	17
Ультразвуковая манжеточная проба ПЗВД	3%		6%		8%		9%	
	[1–4,3]		[1–6,6]		[2–7,8]		[3–8,3]	

Примечание. МАГ – магистральные артерии головы; КИМ – комплекс интима-медиа, ПЗВД – поток-зависимая вазодилатация (норма более 10%). В квадратных скобках указан межквартильный интервал.

Таблица 3

Показатели системы гемореологии и гемостаза при острой и хронической цереброваскулярной патологии

Показатель	Норма	ОНМК (с МПЗ)	ОНМК (без МПЗ)	ХЦВЗ (с МПЗ)	ХЦВЗ (без МПЗ)
АДФ-АТ ¹ , %	40–46*	28,2 ± 3,01*	38,3 ± 4,3	29,5 ± 3,1	41,4 ± 4,5
Адреналин-АТ ² , %	37–43	29,5 ± 3,2	35,4 ± 4,6	25,01 ± 2,8	36,8 ± 4,2
Деформируемость эритроцитов (индекс)	0,52–0,55*	0,43 ± 0,037*	0,51 ± 0,043	0,45 ± 0,044**	0,53 ± 0,023**
Амплитуда агрегации (размер агрегатов)	7–10	10,6 ± 0,74	8,1 ± 0,6	9,3 ± 0,86	7,64 ± 0,61
Время образования монетных столбиков, с	2,5–7*	5,4 ± 0,42*	6,0 ± 0,55	5,8 ± 0,37	6,0 ± 0,62
Время образования трехмерных агрегатов, с	18–50	39 ± 5,64	36,2 ± 4,23	33,6 ± 2,42	33 ± 2,28
Прочность агрегатов, с	79–110*	267,9 ± 18,8*	185 ± 20,6	210,5 ± 16,7	125,6 ± 14,5
Фактор Виллебранда, %	79–110	111 ± 9,3	98,6 ± 10,5	117,5 ± 12,8	104,2 ± 10,6
Гематокрит, %	35–45*	50 ± 2,27*	44,6 ± 2,81	46,4 ± 2,9	39 ± 2,6
Антитромбин III, %	71–115	95,6 ± 8,27	110,4 ± 10,9	112,5 ± 13,2	105,4 ± 10,9
ФА, %	14–18*	12,7 ± 0,11*	17,2 ± 0,12	13,3 ± 0,11**	18,6 ± 0,14**
ИФ, %	0,8–1,2*	0,6 ± 0,05*	0,9 ± 0,012	0,58 ± 0,01**	1,0 ± 0,05**
Фибриноген, г/л	3,2–4,0	3,35 ± 0,30	3,9 ± 0,42	3,5 ± 0,28	3,5 ± 0,31

Примечание. ¹ – агрегация тромбоцитов под влиянием АДФ; ² – агрегация тромбоцитов под влиянием адреналина. Статистически значимые различия показателей: * – ОНМК с МПЗ от нормы; ** – в группе ХЦВЗ (с МПЗ) и ХЦВЗ (без МПЗ).

у больных МПЗ развивается в результате нарушения реологических характеристик эритроцитов (деформируемость и повышенная прочность агрегатов) в сочетании с относительной депрессией фибринолиза и сниженным атромбогенным потенциалом сосудистой стенки.

Обсуждение

Цереброваскулярная патология может являться дебютом МПЗ в виде хронических и острых НМК (и/или транзиторных ишемических атак) [15]. Хроническая ишемия головного мозга часто клинически манифестирует головной болью и/или астеническими жалобами [16], головокружениями, снижением памяти. Существует тесная связь между гематологическими параметрами и цефалгическим синдромом [17, 18], о чем свидетельствуют данные исследований [19, 20], в которых показано, что при ИП и ЭТ головная боль часто является первым проявлением [21]. Это согласуется с полученными в нашем исследовании данными, в которых в 70% случаев головная боль являлась поводом для обращения к врачу и предшествовала установлению диагноза миелопролиферативного заболевания. В связи с этим необходимо рекомендовать исследование общего анализа крови при обращении пациентов с головной болью для исключения МПЗ как причины цефалгического синдрома. Второй по частоте встречаемости клинический неврологический синдром при МПЗ – вестибулярные нарушения, связанные с поражением в первую очередь зон кровоснабжения в системе вертебрально-базиллярных артерий. Больные МПЗ имеют очаговые изменения в субкортикальных отделах лобных и теменных долей, что связано с архитектоникой конечных ветвей средней мозговой артерии, которые, спускаясь с конвексальной поверхности мозга наиболее подвержены тромбированию. Чаще всего (в 72%) эти изменения были связаны с ИП ($n = 23$), что говорит о важной роли формирования эритроцитарных агрегатов, ухудшающих микроциркуляцию, с развитием очагового поражения головного мозга сосудистого генеза. Преобладание неврологических нарушений у женщин, выявленное в настоящем исследовании, согласуется с данными литературы [22].

Одним из важнейших компонентов в системе, поддерживающей гемостаз, является эндотелий. Благодаря антиагрегационной активности сосудистой стенки кровь остается в жидком состоянии, при нарушении этого компенсаторного механизма реализуется тромбоз. Снижение сосудодвигательной функции эндотелия увеличивает риск возникновения тромбозов как на уровне микроциркуляторного русла, так и на уровне магистральных артерий. Ухудшение эластичных свойств сосудистой стенки прогрессирует со временем течения ЦВЗ как у больных МПЗ, так и у пациентов без МПЗ. Это соотносится с нашими данными о снижении ПЗВД в целом у больных МПЗ. Максимально низкие показатели ПЗВД (в среднем 4% при норме 10%) имели пациенты, перенесшие нарушение мозгового кровообращения.

Изменения реологических свойств крови в сторону их протромбогенного состояния отмечались у всех пациентов исследуемой группы. Снижение эластичности эндотелия в сочетании с изменением свойств форменных элементов крови (в особенности эритроцитов) создает предпосылки для реализации и развития тромботических осложнений микро- и макрососудистого русла. Реализация

инсульта зависит от скорости и адекватности включения противосвертывающих систем крови, степени ригидности сосудистой стенки и возможностей коллатерального кровообращения, что существенно затруднено среди больных МПЗ.

Заключение

Особенности течения ЦВП при МПЗ:

- Цефалгический синдром – одно из самых распространенных клинических проявлений ХНМК при МПЗ; в подавляющем большинстве случаев вторичного генеза; зачастую является первым симптомом этого заболевания.

- При проведении МРТ головного мозга у больных МПЗ выявляются очаги сосудистого генеза, часто не проявляющиеся клинически («немые очаги»). Подобное мелкоочаговое поражение головного мозга в отсутствие сопутствующей сосудистой патологии (артериальной гипертензии, атеросклеротического поражения сосудов, нарушений ритма сердца) позволяет говорить о ведущей роли гемореологической составляющей в патогенезе этих изменений. Это в свою очередь свидетельствует о необходимости активных профилактических мероприятий у этой группы пациентов.

- При УЗИ функции эндотелия с помощью ПЗВД различий между подтипами МПЗ не выявлено, однако имеются различия между группой пациентов с симптомами хронической ишемии головного мозга и больных, перенесших инсульт. Самые низкие показатели ПЗВД были в группе пациентов с ОНМК, что свидетельствует о сниженной компенсаторной функции эндотелия, которая вносит свой вклад в развитие острых церебральных событий.

- По данным исследования показателей гемореологии и гемостаза, наибольший вклад вносят изменения реологических характеристик эритроцитов. Так, выраженное снижение деформируемости эритроцитов и увеличения прочности агрегатов ведет к тромбообразованию на уровне микроциркуляторного русла и развитию изменений в сосудистом русле по типу гемореологической микрооклюзии.

- По результатам биохимической манжеточной пробы получены данные о снижении фибринолитической и антиагрегационной составляющей атромбогенной активности эндотелия у больных МПЗ при острой и хронической цереброваскулярной патологии. Это свидетельствует о более высоком риске тромбообразования за счет дисфункции эндотелия у этой группы больных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Шмидт Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга. *Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С.Корсакова*. 1985; 85(9): 1281–8.
- 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 Рн-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз). *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59(4): 31–56.

9. Танашян М.М., Кузнецова П.И., Лагода О.В., Шабалина А.А., Суборцева И.Н., Меликян А.Л. Миелопролиферативные заболевания и ишемический инсульт. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2014; 8(2): 41–5.
11. Меликян А.Л., Суборцева И.Н. Материалы 19-го конгресса европейской гематологической ассоциации (2014 г., Милан). *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2014; 7(4): 598–607.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- University of Washington, Institute for Health Metrics and Evaluation. GBD Compare: Global Burden of Disease data visualizations. Global, deaths, both sexes, all ages, 2010. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. Accessed July 31, 2014.
- Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J., Cushman M., et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015; 131(4): e29–322. doi: 10.1161/CIR.0000000000000152.
- Shmidt E.V. Classification of vascular diseases of the brain and spinal cord. *Journal of neurology and psychiatry n.a. S.S. Korsakov. Russian journal (Zhurnal Nevrologii i psihiatrii imeni Korsakova)*. 1985; 85(9): 1281–8.
- Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008; 22(1): 3–13.
- Hultcrantz M., Wilkes S.R., Kristinsson S.Y., Andersson T.M., Derolf A.R., Eloranta S., et al. Risk and cause of death in patients diagnosed with myeloproliferative neoplasms in Sweden between 1973 and 2005: a population-based study. *J. Clin. Oncol*. 2015; 33(20): 2288–95. doi: 10.1200/JCO.2014.57.6652.
- Brodmann S., Passweg J.R., Gratwohl A., Tichelli A., Skoda R.C. Myeloproliferative disorders: complications, survival and causes of death. *Ann. Hematol*. 2000; 79(6): 312–8.
- De Stefano V., Za T., Rossi E., Florini A., Ciminello A., Luzzi C, et al. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2009; 94(5): 733–7.
- Melikhyan A.L., Turkina A.G., Abdulkadirov K.M., Zaritsky A.U., Afanasiev B.V., Shuvaev V.A., et al. Clinical guidelines for the management of patients with polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2014; 59(4): 31–56.
- Tanashyan M.M., Kuznetsova P.I., Lagoda O.V., Shabalina A.A., Subortseva I.N., Melikhyan A.L. Myeloproliferative diseases and ischemic stroke. *Annals of Clinical and Experimental Neurology. Russian journal (Annaly Nevrologii)*. 2014; 8(2): 41–5.
- Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P., Longo G., Pancrazzi A., Ponziani V., et al.; MPD Research Consortium. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia*. 2007; 21(9): 1952–9.
- Melikhyan A.L., Subortseva I.N. 19-th European association of hematology Congress Materials (2014, Milan). *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice. Russian Journal (Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika)*. 2014; 7(4): 568–607.
- Lussana F., Caberlon S., Pagani C., Kamphuisen P.W., Buller H.R., Cattaneo M. Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb. Res*. 2009; 124(4): 409–17. doi: 10.1016/j.thromres.2009.02.004.
- Celermajor D.S. Testing endothelial function using ultrasound. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1998; 32(3): 29–32.
- Clauss A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. *Acta Haematol*. 1957; 17(4): 237–46.
- Blumenthal D.T., Glenn M.J. Neurological manifestation of hematological disorders. *Neurol. Clin*. 2002; 20(1): 265–81, viii.
- Michiels J.J., Berneman Z., Schroyens W., Koudstaal P.J., Lindemans J., Neumann N.A. Platelet-mediated erythromelalgic, cerebral, ocular and coronary microvascular ischemic and thrombotic manifestations in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera: A distinct aspirin-responsive and oumadin-resistant arterial thrombophilia. *Platelets*. 2006; 17(8): 528–44.
- Edmeads J. Headache in the elderly. In: Olesen J, Tfelt-Hansen P, Welch K.M.A., eds. *The headaches*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000: 947–51.
- Fairbanks V.F., Beutler E. Iron deficiency. In: Beutler E., Lichtman M.A., Coller B.S., Kipps T.J., eds. *Williams hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill Inc.; 1995: 490–511.
- Ferrant A. What clinical and laboratory data are indicative of polycythemia and when are blood volume samples needed? *Nouv. Rev. Fr. Hematol*. 1994; 36(2): 151–4.
- Newton L.K. Neurologic complications of polycythemia and their impact on therapy. *Oncology*. 1990; 4(3): 59–64.
- Frewin R., Dowson A. Headache in essential thrombocythemia. *Int. J. Clin. Practice*. 2012; 66(10): 976–83. doi: 10.1111/j.1742-1241.2012.02986.x.
- Kesler A., Ellis M.H., Manor Y., Gadoth N., Lishner M. Neurological complications of essential thrombocytosis (ET). *Acta Neurol. Scand*. 2000; 102(5): 299–302.

Поступила 18.05.16
Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.356.03:616-005.1-953.2-084

Божбанбаева Н.С., Сатбаева Э.М., Сейталиева А.М., Алтынбаева Г.Б., Сулейменова И.Е., Пичхадзе Г.М.

ОПЫТ ПОВТОРНОГО ВВЕДЕНИЯ ВИТАМИНА К₁ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

Кафедра фармакологии Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, 050000, г. Алматы, Республика Казахстан

Цель настоящего исследования – изучение эффективности повторного введения витамина К₁ у недоношенных детей. Вводили 88 недоношенным детям витамин К₁ в первые часы жизни после рождения в дозе 1 мг внутримышечно, затем повторно – на 7, 14, 21-й дни жизни. Новорожденные из контрольной группы получали витамин К₁ в дозе 1 мг лишь однократно при рождении. Эффективность повторного введения витамина К₁ оценивали по результатам клинических, лабораторно-инструментальных данных на 21-й день жизни. Результаты исследования показали, что повторное введение витамина К₁ в комбинации с посиндромной терапией сокращает сроки пребывания детей в ОРИТ (15 ± 5,3 дня в основной группе; 18 ± 6 дней в контрольной группе), способствует улучшению показателей гемостаза – уменьшению активированного парциального тромбопластинного времени (АПТВ) по сравнению с детьми группы контроля (с 53 до 29 с; $p < 0,005$), тенденции к повышению протромбинового индекса в динамике (с 59,6 ± 7,2% до 86,7 ± 5%; $p < 0,005$), снижению риска развития геморрагического синдрома, оптимизации прогноза (статистически значимое снижение числа детей с ретинопатией в основной группе 6,5 ± 3,6%; во второй группе 23,8 ± 6,6%; $p < 0,05$).

К л ю ч е в ы е с л о в а : геморрагическая болезнь новорожденных; геморрагический синдром; витамин К₁; гемостаз; коагулограмма.

Для цитирования: Божбанбаева Н.С., Сатбаева Э.М., Сейталиева А.М., Алтынбаева Г.Б., Сулейменова И.Е., Пичхадзе Г.М. Опыт повторного введения витамина К₁ для профилактики геморрагического синдрома у недоношенных детей. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 150–153. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-150-153

Bozhanbayeva N.S., Satbaeva E.M., Seytalieva A.M., Altynbayeva G.B., Suleimenova I.E., Pichkhadze G.M.

THE EXPERIENCE OF THE REPEATED ADMINISTRATION OF VITAMIN K FOR THE PREVENTION OF HEMORRHAGIC SYNDROME IN PREMATURE INFANTS

S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, 050000, Kazakhstan

The purpose of this study is the investigation of the effectiveness of the repeated administration of vitamin K₁ to preterm infants. 88 preterm infants were administered vitamin K₁ in first hours of life at a dose of 1 mg intramuscularly, then repeatedly at 7th, 14th, 21th day after birth. Infants in the control group received vitamin K₁ in a dose of 1 mg once at birth. The effectiveness of repeated administration of vitamin K₁ was evaluated by the results of clinical, laboratory and instrumental data on the 21th day of life. The results showed that repeated administration of vitamin K₁ reduces the length of stay of children in the ICU (15 ± 5.3 days in the study group, 18 ± 6 days in the control group), decreases of activated partial thromboplastin time as compared to the control group (53 to 29; $p < 0.005$), increases of prothrombin index (from 59.6 ± 7.2% to 86.7 ± 5%; $p < 0.005$), decreases of the number of children with retinopathy (6.5 ± 3.6% in the study group and 23.8 ± 6.6%; in the control ($p < 0.05$)).

Key words: hemorrhagic disease of the newborn; haemorrhagic syndrome; vitamin K₁; hemostasis.

For citation: Bozhanbayeva N.S., Satbaeva E.M., Seytalieva A.M., Altynbayeva G.B., Suleimenova I.E., Pichkhadze G.M. The experience of the repeated administration of vitamin K for the prevention of hemorrhagic syndrome in premature infants. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(3): 150-153. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-150-153

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 22 Dec 2015

Accepted 17 July 2016

Геморрагическая болезнь новорожденных (ГБН) является приобретенным расстройством коагуляции, которое зависит от витамина К (факторы свертывания ФII, ФVII, ФIX и ФX). Диагноз основывается на кровотечении у новорожденного ребенка с длительным протромбиновым временем и нормальными показателями тромбоцитов и фибриногена в плазме крови [1–4]. Высокий риск развития геморрагических осложнений у новорожденных обусловлен, во-первых, особенностями плазменного звена гемостаза у новорожденных (дефицит витамин К-зависимых факторов коагуляции), дефицитом факторов контакта (ФXI, ФXII), а также определенной незрелостью сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, особенно у недоношенных детей [1, 5, 6]. Концентрация витамина К₁ в крови плода и запасы его к моменту рождения крайне малы ввиду низкого градиента перехода витамина К через плацентарный барьер [7].

В настоящее время для профилактики ГБН во многих странах используют препараты витамина К₁, которые показали свою эффективность во многих исследованиях [5, 8–10]. Рекомендуют однократное парентеральное введение витамина К₁ после рождения ребенка. Вопрос о повторном назначении витамина К₁ новорожденным, особенно недоношенным детям, остается открытым. Вместе с тем дети с малой массой тела при рождении составляют группу высокого риска по развитию геморрагической болезни новорожденных в силу выраженного дефицита витамина К₁ и особенностей системы гемостаза в целом.

Цель нашего исследования – изучить эффективность повторного введения витамина К₁ у недоношенных детей.

Материал и методы

Под нашим наблюдением находились 88 недоношенных детей, родившихся в Центре перинатологии и детской кардиохирургии г. Алматы в июле 2015 г.

Критерии включения: недоношенные дети с массой тела при рождении от 500 до 2500 г, родившиеся при сроке гестации с 22 до 37 нед в Центре перинатологии и детской кардиохирургии г. Алматы в июле 2015 г., находившиеся в ОРИТ новорожденных. Возраст – период новорожденности.

Критерии исключения: в исследование не входили дети, родившиеся в срок с малой массой тела при рождении (маловесные к сроку гестации).

Недоношенным детям, пребывавшим на стационарном лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных, мы вводили витамин К₁ в первые часы жизни после рождения в дозе 1 мг внутримышечно, затем повторно в рекомендуемые сроки по Н.П. Шабалову [1] еженедельно: на 7, 14, 21-й дни жизни в той же дозе. Эти дети

составили основную группу (1-я группа – 46 детей). Недоношенных детей, родившихся в аналогичный период в данном Центре и пребывавших в ОРИТ и получавших витамин К₁ лишь однократно при рождении в дозе 1 мг, мы включили в контрольную группу (2-я группа – 42 ребенка).

Эффективность повторного введения витамина К₁ оценивали по результатам клинических и лабораторно-инструментальных данных. Всем детям проводили общеклинические – общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимические (общий белок, трансаминазы, С-реактивный белок, глюкоза крови) исследования, кровь на электролиты, коагулограмму (протромбиновый индекс – ПТИ, активированное парциальное тромбопластиновое время – АПТВ, фибриноген) на аппарате Sysmex CA-500 series (multifibren U, thromborel S, test thrombin reagent, pathromin SL), а также нейровизуализацию, эхокардиографию, рентгенографию органов грудной клетки. Для оценки влияния витамина К₁ на систему гемостаза, исследование коагулограммы проводили двукратно: на 7-й и 21-й дни жизни. Эту процедуру не проводили многократно, учитывая ее инвазивность и малую массу тела ребенка.

Результаты исследования подвергнуты статистической обработке с помощью программы (XLSTAT-про MS Excel). Для описания нормально распределенных параметров мы использовали среднюю арифметическую и стандартное отклонение среднего арифметического. Критерий Стьюдента использован для проверки гипотезы о различии средних для двух групп (основной и контрольной). Контролирование ошибки проводили сбором данных. Разработана специальная карта для регистрации результатов клинико-лабораторных и инструментальных исследований у недоношенных детей.

Вид исследования – когортное проспективное. Нулевая гипотеза – недоношенным детям для профилактики поздней геморрагической болезни новорожденных не показано повторное введение витамина К₁. Альтернативная гипотеза – недоношенным детям для профилактики поздней геморрагической болезни новорожденных показано повторное введение витамина К₁. Отбор сравниваемых групп проводили тщательно.

Результаты и обсуждение

Мы изучили анамнестические данные, течение беременности и родов у матерей недоношенных детей. В возрастной структуре матерей с преждевременными родами 55,7% женщин были репродуктивного возраста от 25 до 35 лет, 26,1% – от 16 до 25 лет, 18,2% – 35 лет и старше. У 54,5% преждевременно родивших женщин акушерский анамнез был отягощен самопроизвольными выкидышами, случаями замершей беременности, бесплодием, мертворождениями. У каждой третьей женщины предыдущие беременности завершились преждевременными родами.

Течение настоящей беременности протекало на фоне персистирующей инфекции у 56,8% женщин, анемии у 30,7%, тяжелой преэклампсии у 2%, угрозы прерывания беременности у 23,4%, ОРВИ 23,4%, задержки внутриутробного развития плода 11,4%, режы – многоводия у 8%, маловодия у 6,8%, сахарного диабета у 5,7%, истмико-цервикальной недостаточности – у 4,5%, гестационной тромбоцитопении – у 3,4%. Врожденный порок сердца был диагностирован пренатально у каждого пятого плода (20,4%).

При распределении недоношенных детей по весовой категории в двух группах установлено, что 37 (42%) новорожденных родились с очень низкой массой тела, 33 (37,5%) – с экстремально низкой массой тела, 18 (20,5%) – с низкой массой тела. Состояние 31 (35,2%) ребенка расценивали при рождении как крайне тяжелое, 57 (64,7%) как тяжелое за счет перенесенной асфиксии в родах. Последняя

Для корреспонденции:

Сатбаева Эльмира Маратовна, кандидат мед. наук, заведующая кафедрой фармакологии Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова, 050000, г. Алматы, Республика Казахстан. E-mail: e.satbaeva@mail.ru.

For correspondence:

Satbaeva Elmira, MD, PhD, Head of the Department of Pharmacology, S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, 050000, Kazakhstan. E-mail: E.Satbaeva@mail.ru.

Information about authors:

Seytalieva A., <http://orcid.org/0000-0003-0177-5599>;
Satbaeva E., <http://orcid.org/0000-0002-5521-5776>.

Сравнительный анализ показателей коагулограммы в динамике

Маркер	7-й день		21-й день	
	1-я группа (n = 46)	2-я группа (n = 42)	1-я группа (n = 46)	2-я группа (n = 42)
АПТВ, с	53,0 ± 6,8	48,0 ± 7,7	29,0 ± 6,7 *	40,0 ± 7,5
ПТИ, %	59,6 ± 7,2	57,2 ± 7,7	86,7 ± 5,0*	68,1 ± 7,1**
Фибриноген, г/л	1,5 ± 1,7	1,3 ± 1,7	2,0 ± 2,0	1,7 ± 1,9

Примечание. * – $p < 0,005$ – статистическая значимость различий в 1-й (основной) группе в динамике на 7-й и 21-й дни жизни; ** – $p < 0,05$ – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группами на 21-й день жизни. АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время; ПТИ – протромбиновый индекс.

подтверждалась низкой оценкой по шкале Апгар (79 детей, или 89,7%, родились с оценкой 5 баллов и меньше) и показателями рН пуповинной крови при рождении (7 и меньше). Обнаружена прямая корреляционная связь между массой тела и оценкой по шкале Апгар. Таким образом, недоношенные дети рождались в состоянии асфиксии, что усугубляло их состояние и являлось причиной транспортировки этих детей в ОРИТ новорожденных.

Тяжесть состояния детей была обусловлена перенесенной асфиксией в родах, дыхательной недостаточностью, связанной с респираторным-дистресс синдромом (РДС) 1-го типа (79,5%), внутриутробной пневмонией (20,5%), их сочетанием (36,3%), которые были подтверждены рентгенологическими данными в 1-е сутки жизни.

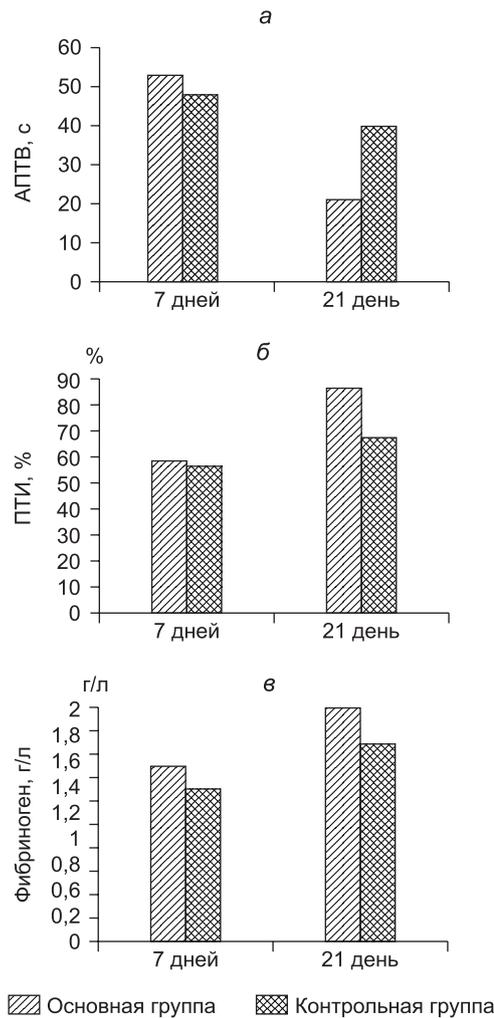
Помимо дыхательной недостаточности 54 (61,3%) новорожденных имели признаки поражения центральной нервной системы в виде: синдрома угнетения – 45 (84%), синдрома гипервозбудимости – 9 (16%), судорожного синдрома – 5 (9%). При нейровизуализации на 2-е, 3-и сутки жизни регистрировали гипоксические изменения в головном мозге у 48 (54,5%) детей, внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) – у 31 (35,2%) ребенка, при этом ВЖК 1-й степени диагностированы у 35,4% из 48 детей, 2-й степени у 48,4%, 3-й степени у 16,2%.

Кардиоваскулярные нарушения в виде сердечно-сосудистой недостаточности 1-й, 2-й степени в первые дни жизни отмечены у 60 (68,2%) детей. При эхокардиографическом обследовании выявлен врожденный порок сердца в виде дефекта межжелудочковой перегородки у 18 (20,4%), а также фетальные коммуникации – открытое овальное окно, открытый артериальный проток у 19 (21,5%) детей, среди которых гемодинамически значимый открытый артериальный проток отмечен у 31,5%.

Диагностику и лечение недоношенных детей проводили согласно клиническому протоколу «Крайняя незрелость», утвержденному на заседании Экспертной комиссии по вопросам развития здравоохранения Минздрава Республики Казахстан № 6 от 04.05.2014. После оказания первичной реанимационной помощи новорожденным в родильной палате детей сразу транспортировали в условиях транспортного кювеза в ОРИТ новорожденных. Врачи-неонатологи учли все моменты, наиболее важные для недоношенных детей из группы высокого риска развития РДС: заместительная терапия экзогенным сурфактантом, поддержание нормального температурного режима, профилактика постнатальной гипоксии и нормогликемии. Терапию сурфактантом однократно получили 44,3% детей, повторно – 9%. Учитывая тяжесть состояния ребенка, с рождения начата стартовая антибактериальная терапия ампициллином (50 мг/кг) и гентамицином (5 мг/кг), посиндромная терапия, контроль сахара и электролитов крови. Детям с сердечно-сосудистой недостаточностью назначали инотропную поддержку в виде допамина из расчета 5 мкг/кг. Большинство детей в первые 7 дней жизни находились на парентеральном питании.

С целью профилактики геморрагического синдрома всем недоношенным детям в первый час после рождения была введена инъекционная форма витамина К₁ в дозе 1 мг. Детям основной группы вводили витамин К₁ в этой же дозировке повторно по схеме: 1 раз в неделю на 7, 14, 21-й дни жизни. На 7-й и 21-й дни жизни проводили исследование коагулограммы у детей основной и контрольной группы (см. таблицу).

В результате исследования в коагулограмме у детей 1-й группы (см. рисунок, а) на 21-й день жизни наблюдалось статистически значимое снижение АПТВ в динамике ($p < 0,005$). Протромбиновый индекс статистически значимо повышался в 1-й группе ($p \leq 0,005$), в то время как во 2-й группе этот показатель оставался на низком уровне. При сравнении значения протромбинового индекса (см. рисунок, б) в двух группах на 21-й день жизни выявлены статистически значимые различия, т.е. у детей, получавших витамин К₁



Динамика средних показателей (x-bar) у детей основной и контрольной групп.

а – активированное парциальное тромбопластиновое время; б – протромбиновый индекс; в – концентрация фибриногена.

после рождения трехкратно, отмечалось значительное повышение уровня протромбинового индекса (с $59,6 \pm 7,2\%$ до $86,7 \pm 5,0\%$; $p \leq 0,005$) по сравнению с детьми, которым вводили витамин К₁ лишь однократно после рождения (см. рисунок, в). Не выявлено статистически значимой разницы в динамике концентрации фибриногена на 21-й день жизни в двух группах (см. таблицу), значение этого показателя существенно не менялось и оставалось в пределах нормы, что характерно для ГБН [7].

В динамике на 21-й день жизни у детей 1-й группы отмечалось клиническое улучшение в виде купирования симптомов дыхательной, сердечно-сосудистой недостаточности, судорожного синдрома. По данным нейросонографии, у детей основной группы наблюдались ВЖК в стадии разрешения, повторных внутричерепных геморрагий и каких-либо проявлений геморрагического синдрома не отмечено. В контрольной группе мы наблюдали 2 детей, у которых возникли ВЖК в позднем неонатальном периоде, у 1 ребенка отмечено диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови в виде желудочно-кишечного кровотечения.

Стабилизация состояния недоношенных детей отразилась в количестве койко-дней. Средняя продолжительность пребывания в ОРИТ новорожденных, получавших повторно витамин К₁, составила $15 \pm 5,3$ дня, в то время как в группе контроля длительность госпитализации детей в ОРИТ была в среднем 18 ± 6 дней.

Таким образом, в динамике на 21-й день жизни после трехкратного внутримышечного введения витамина К₁ в основную группу не отмечалось повторного развития геморрагического синдрома, наблюдалась нормализация показателей коагулограммы.

В исходе у 4 детей 1-й группы и у 6 детей 2-й группы развилась среднетяжелая форма бронхолегочной дисплазии, в связи с чем они были переведены в отделение патологии новорожденных, где продолжали получать лечение. Гидроцефалия как последствие

перенесенного ВЖК 3-й степени отмечалась у 3 недоношенных детей, из них у 1 ребенка 1-й группы и 2 детей 2-й группы. Анемия недоношенных была документирована перед переводом из ОРИТ в ОПН у 12 детей 1-й группы и у 14 2-й (контрольной) группы без статистически значимых различий. Анемия была нетяжелая, и дети не нуждались в гемотрансфузиях. Ретинопатию 1-й, 2-й степени зарегистрировали у 13 пациентов (у 3 детей из 1-й группы $6,5 \pm 3,6\%$, у 10 – из 2-й группы – $23,8 \pm 6,6\%$; $p \leq 0,05$). Случаев некротического энтероколита не наблюдалось ни у одного ребенка. В единичных случаях отмечалась желтуха, обусловленная нарушением конъюгационной функции печени.

Таким образом, повторное введение витамина K_1 в комбинации с посиндромной терапией приводило к укорочению продолжительности госпитализации в ОРИТ, нормализации показателей гемостаза, снижению риска развития геморрагического синдрома, улучшало прогноз у недоношенных детей.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабалов Н.П. *Неонатология*. М.: МЕДпресс-информ; 2009.
2. Лобанов А.И., Лобанова О.Г. Геморрагическая болезнь новорожденных с поздним дебютом. *Вопросы современной педиатрии*. 2011; 1: 167–71.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notes from the field: late vitamin K deficiency bleeding in infants whose parents declined vitamin K prophylaxis – Tennessee, 2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2013; 62(45): 901–2.
4. Wariyar U., Hilton S., Pagan J., Tin W., Hey E. Six years experience of prophylactic oral vitamin K. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed.* 2000; 82(1): F64–8.
5. Darlow B.A., Phillips A.A., Dickson N.P. New Zealand surveillance of neonatal vitamin K deficiency bleeding (VKDB): 1998–2008. *J. Paediatr. Child. Health.* 2011; 47(7): 460–4. doi: 10.1111/j.1440-1754.2010.01995.x.
6. Крестелёва И.М., Шишко Г.А., Севрук О.В., Тимошина Л.А. Проблемы лечения геморрагической болезни у новорожденных. *Медицинские новости*. 2014; 9: 60–2.
7. Нароган М.В., Карпова А.Л., Строева Л.Е. Витамин К-дефицитный геморра-

гический синдром у новорожденных и детей первых месяцев жизни. *Неонатология: новости, мнения, обучение*. 2015; 3: 74–82.

8. Ozdemir MA, Karakucu M, Per H, Unal E, Gumus H, Patiroglu T. Late-type vitamin K deficiency bleeding: experience from 120 patients. *Childs Nerv. Syst.* 2012; 28(2): 247–51.
9. Takahashi D, Shirahata A, Itoh S, Takahashi Y, Nishiguchi T, Matsuda Y. Vitamin K prophylaxis and late vitamin K deficiency bleeding in infants: fifth nationwide survey in Japan. *Pediatr. Int.* 2011; 53(6): 897–901.
10. Puckett R.M., Offringa M. Prophylactic vitamin K for vitamin K deficiency bleeding in neonates. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2000; (4): CD002776. DOI: 10.1002/14651858.CD002776.

REFERENCES

1. Shabalov N.P. *Neonatology*. 5th ed. Moscow: MEDpress-inform; 2009. (in Russian)
2. Lobanov A.I., Lobanova O.G. Hemorrhagic disease of newborns with late debut. *Current Pediatrics. Russian journal (Voprosy Sovremennoi Pediatrii)*. 2011; 1: 167–71 (in Russian).
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notes from the field: late vitamin K deficiency bleeding in infants whose parents declined vitamin K prophylaxis – Tennessee, 2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2013; 62(45): 901–2.
4. Wariyar U., Hilton S., Pagan J., Tin W., Hey E. Six years experience of prophylactic oral vitamin K. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed.* 2000; 82(1): F64–8.
5. Darlow B.A., Phillips A.A., Dickson N.P. New Zealand surveillance of neonatal vitamin K deficiency bleeding (VKDB): 1998–2008. *J. Paediatr. Child. Health.* 2011; 47(7): 460–4. doi: 10.1111/j.1440-1754.2010.01995.x.
6. Krasteleva I.M., Shishko G.A., Sevruk O.V., Timoshina L.A. Problems of treatment of hemorrhagic disease in newborn. *Medical news. Russian journal (Meditsinskie novosti)*. 2014; 9: 60–2. (in Russian)
7. Narogan M.V., Karпова A.L., Stroeва L.E. Vitamin K deficient hemorrhagic syndrome in newborns and young infants. *Neonatology: news, opinions, training. Russian journal (Neonatologiya: novosti, mneniya, obucheniye)*. 2015; 3: 74–82. (in Russian)
8. Ozdemir MA, Karakucu M, Per H, Unal E, Gumus H, Patiroglu T. Late-type vitamin K deficiency bleeding: experience from 120 patients. *Childs Nerv. Syst.* 2012; 28(2): 247–51.
9. Takahashi D, Shirahata A, Itoh S, Takahashi Y, Nishiguchi T, Matsuda Y. Vitamin K prophylaxis and late vitamin K deficiency bleeding in infants: fifth nationwide survey in Japan. *Pediatr. Int.* 2011; 53(6): 897–901.
10. Puckett R.M., Offringa M. Prophylactic vitamin K for vitamin K deficiency bleeding in neonates. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2000; (4): CD002776. DOI: 10.1002/14651858.CD002776.

Поступила 22.12.15

Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 612.112.083:615.471

Петрова О.В., Шабанова Г.Р., Егорова Т.Г.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ КОЛИЧЕСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ И ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ У ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АВТОМАТИЧЕСКОГО ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА SYSMEX XT 2000i

ФГБУ Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии Минздрава России, 411011, г. Астрахань, Россия

Современные международные стандарты рекомендуют каждой лаборатории разработать свои или подтвердить имеющиеся в литературе референтные интервалы для каждого лабораторного показателя. Цель работы – установить референтные интервалы количества лейкоцитов в периферической крови и лейкоцитарной формулы у взрослого населения Астраханской области на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 2000i. У 375 практически здоровых мужчин и женщин, жителей Астрахани и Астраханской области, определяли количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 2000i с помощью проточной цитометрии и цитофлюориметрии. Установлено, что средние значения количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы не зависят от пола. Установленные нами интервалы лейкоцитов и лейкоцитарной формулы могут быть использованы в качестве референтных в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии (г. Астрахань), в лабораториях Астраханской области при работе на аналогичных аналитических системах (автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 2000i).

Ключевые слова: референтный интервал; лейкоциты; лейкоцитарная формула; взрослое население; Астраханская область; автоматический гематологический анализатор Sysmex XT 2000i.

Для цитирования: Петрова О.В., Шабанова Г.Р., Егорова Т.Г. Референтные интервалы количества лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формулы у взрослого населения при применении автоматического гематологического анализатора Sysmex XT 2000i. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 153-156. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-153-156

Petrova O.B., Shabanova G.R., Egorova T.G.

REFERENCE INTERVALS FOR THE WHITE BLOOD CELL AND DIFFERENTIAL WHITE BLOOD CELL COUNT IN THE ADULT POPULATION AT THE USE OF THE AUTOMATIC HEMATOLOGY ANALYZER SYSMEX XT 2000i

Federal Center for Cardiovascular Surgery, Astrakhan, 414011, Russian Federation

Modern international standards recommend to each laboratory to develop or to confirm the reference intervals for laboratory parameters. The purpose of the study was to establish reference intervals for the quantity of white blood cell and differential white blood cell count in the adult population of the Astrakhan region at the use of the automatic hematology analyzer Sysmex XT 2000i. In the group of 375 healthy people there

were determined the white blood cell and differential white blood cell count by the flow cytometry and the cytofluorometry. The reference intervals for the white blood cell and differential white blood cell count didn't depend on a gender.

Key words: reference interval; leukocytes; leukogram; Astrakhan region; automatic hematology analyzer Sysmex XT 2000 i.

For citation: Petrova O.B., Shabanova G.R., Egorova T.G. Reference intervals for the white blood cell and differential white blood cell count in the adult population at the use of the automatic hematology analyzer Sysmex XT 2000i. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(3): 153-156. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-153-156

Acknowledgments. The authors express gratitude to Tarasova D.G., Shashina S.A. for assistance in the organization of research.

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 23 Nov 2015

Accepted 12 May 2016

В понятие «общеклиническое исследование крови» входят определение концентрации гемоглобина, подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов, лейкоцитарной формулы. Количество лейкоцитов в периферической крови и лейкоцитарная формула имеют диагностическое значение. На основании исследования данных показателей крови можно оценить тяжесть состояния пациента, эффективность проводимой терапии, а иногда установить клинический диагноз [1–4].

Для определения количества лейкоцитов в периферической крови и лейкоцитарной формулы используют гематологические автоматические анализаторы разных фирм-производителей.

Оценку результата лабораторного исследования проводят с помощью референтного интервала (РИ).

Клинические лаборатории используют РИ, указанные в инструкциях к наборам реактивов или руководствах по эксплуатации анализаторов, полученные при обследовании населения стран-производителей реактивов с их расовыми, этническими и географическими особенностями. Использование РИ, установленных на другой популяции, может привести к ошибкам при интерпретации результатов исследования [5–7].

В связи с этим зарубежные и отечественные сообщества по клинической лабораторной диагностике рекомендуют каждой лаборатории установить РИ для каждого лабораторного параметра или подтвердить имеющиеся в справочной литературе данные о РИ [8–10].

Цель работы – установить РИ количества лейкоцитов в периферической крови и лейкоцитарной формулы у взрослого населения Астраханской области на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 2000i.

Материал и методы

Для установления РИ использовали классический подход с применением строгих критериев включения и исключения, расчет РИ [11–17]. Критерий включения в исследование – практически здоровые лица.

Критерий исключения пациентов из исследования: наличие острых и хронических бактериальных и вирусных инфекций, аллергических реакций, беременность, прием лекарственных препаратов, влияющих на количество лейкоцитов в периферической крови и показатели лейкоцитарной формулы.

Исследования проводили в рамках профилактического медицинского осмотра в Федеральном центре сердечно-сосудистой хирургии (г. Астрахань). Все участники исследования дали свое информированное согласие.

Референтная группа была сформирована из 150 мужчин и 250 женщин, здоровых жителей города Астрахани и Астраханской области, в возрасте от 21 года до 60 лет (средний возраст $37,59 \pm 0,88$ года).

Стандартизация преаналитического долабораторного этапа была обеспечена инструкциями для медицинского персонала (инструкция по подготовке пациентов к лабораторным исследованиям, инструкция по правилам взятия крови для лабораторных исследований, хранения и транспортировки биологического материала).

Образцы крови для исследования собирали путем пункции кубитальной вены после наложения жгута (не более 1 мин) в положении пациента лежа с помощью двухкомпонентных систем для забора крови – одноразовых полипропиленовых пробирок с K_2 -ЭДТА («Sarstedt», Германия).

Для корреспонденции:

Петрова Ольга Владимировна, кандидат мед. наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии Минздрава России, 414011, г. Астрахань, Россия. E-mail: students_asma@mail.ru.

For correspondence:

Petrova Olga V., PhD., head of the laboratory, Federal Center for Cardiovascular Surgery, Astrakhan, 414011, Russian Federation. E-mail: students_asma@mail.ru.

Information about authors:

Petrova O.V., <http://orcid.org/0000-0003-3544-2266>; Shabanova G.R., <http://orcid.org/0000-0003-2233-7002>; Egorova T.G., <http://orcid.org/0000-0002-4660-6329>.

Образцы крови доставляли в лабораторию в течение 15–20 мин после венопункции и анализировали в течение 30–35 мин с момента поступления.

Стандартизация преаналитического лабораторного этапа была обеспечена оценкой поступающего биологического материала в лабораторию на наличие сгустков. При проведении исследования в каждом случае использовали первичную пробирку и систему автоматической подачи образцов.

Стандартизация аналитического этапа была обеспечена:

- ежегодным техническим обслуживанием автоматического гематологического анализатора Sysmex XT 2000i («Sysmex Corporation», Япония);
- ежедневной проверкой стабильности аналитической системы с использованием сертифицированных контрольных материалов для проведения внутрилабораторного контроля качества, согласно инструкции по эксплуатации прибора;
- участием лаборатории в Федеральной системе внешней оценки качества лабораторных исследований;
- наличием лабораторной информационной системы [18].

Исследование количества лейкоцитов (WBC, $10^9/\text{л}$) в периферической крови проводили с помощью проточной цитометрии, согласно инструкции производителя, на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 2000i.

Автоматическую дифференцировку лейкоцитарной формулы проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 2000i с помощью проточной цитофлюориметрии.

При дифференцировке лейкоцитарной формулы определяли: абсолютное (Neut, $10^9/\text{л}$) и относительное количество нейтрофилов (Neut, %); абсолютное (Lymph, $10^9/\text{л}$) и относительное количество лимфоцитов (Lymph, %); абсолютное (Mono, $10^9/\text{л}$) и относительное количество моноцитов (Mono, %); абсолютное (EO, $10^9/\text{л}$) и относительное количество эозинофилов (EO, %); абсолютное (Baso, $10^9/\text{л}$) и относительное количество базофилов (Baso, %); абсолютное (IG, $10^9/\text{л}$) и относительное количество незрелых гранулоцитов (IG, %).

Все статистические процедуры выполняли с помощью программного пакета Statistica 6.0 for Windows («StatSoft Inc.», США). Вычисляли X – среднее арифметическое и SD (стандартное отклонение). Тип распределения определяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Для оценки различий средних тенденций между группами использовали t -критерий Стьюдента. Разделение считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты

Для определения РИ использовали статистические подходы, рекомендованные Институтом клинических и лабораторных стандартов CLSI A28-3 [11].

На первом этапе исследования определяли и исключали из дальнейшего исследования статистические выбросы при исследовании количества лейкоцитов в периферической крови и лейкоцитарной формулы. Выбросы определяли с помощью метода Тьюки [11] на основе интервала нормальных значений: $[Q_1 - 1,5 \times IQR, Q_3 + 1,5 \times IQR]$, где Q_1, Q_3 – границы первого и третьего квартилей, $IQR = Q_3 - Q_1$ – межквартильный размах. С помощью метода Тьюки из исследования исключили 25 результатов определения количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, что составило 6,25%.

В связи с имеющимися сведениями о половых различиях количества лейкоцитов в периферической крови и показателей лейкоцитарной формулы [1–3, 19, 20] на втором этапе исследования мы рассчитали X и SD этих показателей у мужчин и женщин отдельно (табл. 1), однако статистически значимых различий не выявлено. В связи с этим для получения единых РИ количества лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы у мужчин и женщин объединили в одну группу для расчета X и SD .

Согласно стандартам, способ (метод) расчета РИ зависит от численности референтной группы и типа распределения значений лабораторного показателя. При численности группы меньше 120 человек и «ненормальном» распределении лабораторных показателей используют расчет РИ в виде 5–95%, согласно которому у 90% здоровых лиц обнаруживают «нормальные» лабораторные показатели и у 10% здоровых лиц «ненормальные». При численности группы

Таблица 1

Среднее значение (X) и стандартное отклонение (SD) количества лейкоцитов в периферической крови и показателей лейкоцитарной формулы у мужчин и женщин

Показатель	Мужчины ($n = 140$)		Женщины ($n = 235$)	
	X	SD	X	SD
WBC, $\times 10^9/\text{л}$	5,93	1,0	5,9	1,32
Neut, $\times 10^9/\text{л}$	3,15	0,58	3,47	0,1
Lymph, $\times 10^9/\text{л}$	1,92	0,44	1,82	0,40
Mono, $\times 10^9/\text{л}$	0,61	0,14	0,57	0,13
EO, $\times 10^9/\text{л}$	0,16	0,13	0,13	0,12
Baso, $\times 10^9/\text{л}$	0,31	0,013	0,30	0,02
Neut, %	54,31	6,14	57,5	5,54
Lymph, %	31,9	3,06	29,9	4,51
Mono, %	9,7	0,75	9,33	1,7
EO, %	1,79	0,73	1,94	1,14
Baso, %	0,55	0,28	0,5	0,33
IG, $\times 10^9/\text{л}$	0,004	0,0065	0,004	0,0065
IG, %	0,03	0,06	0,03	0,06

Примечание. Здесь и в табл. 2: IG – незрелые гранулоциты (immature granulocytes).

больше 120 человек и «нормальном» распределении лабораторных показателей используют расчет РИ в виде $X_{\text{cp}} \pm 1,96SD$, согласно которому у 95% здоровых лиц обнаруживают «нормальные» лабораторные показатели и 5% здоровых лиц – «ненормальные» [11].

В нашем исследовании распределение изучаемых показателей было «нормальным», и численность референтной группы составила 375 человек, следовательно, РИ должен быть рассчитан по формуле $X_{\text{cp}} \pm 1,96SD$ [11].

Расчетные X , SD количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, РИ, полученные нами и указанные в справочной литературе, представлены в табл. 2.

Сопоставить полученные нами РИ с РИ, указанными в справочной литературе [1–3, 19, 20], не представляется возможным, так как в справочной литературе не указана численность референтных групп и не указан способ (автоматический подсчет или подсчет в камере Горяева) определения количества лейкоцитов и дифференцировки лейкоцитарной формулы (автоматический или в мазке крови).

Обсуждение

Общеклиническое исследование крови является одним из наиболее доступных и информативных исследований, которое востребовано клиницистами всех специальностей. В последние годы автоматизированный анализ крови пришел на смену ручных методик. Автоматизированные гематологические анализаторы в отличие от ручных методик используют стандартизированные химические и физические методы, в том числе и проточную цитометрию с флуоресцентным красителем.

Использовать РИ, указанные в инструкции по эксплуатации гематологического анализатора, не представляется возможным, так как они установлены на другой популяции.

Кроме того, использовать в работе РИ, указанные в современных отечественных справочниках по лабораторной диагностике, также нельзя, так как авторы ссылаются на работы 1950–1980-х годов [1, 2].

Отсутствие региональных РИ показателей гемограммы затрудняет использование современных автоматических анализаторов. В связи с чем мы установили РИ количества лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы у взрослого населения Астраханской области на автоматическом гематологическом анализаторе.

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что мы не выявили статистически значимых различий в средних значениях количества лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы у мужчин и женщин Астраханской области. Полученные нами данные совпадают с данными других авторов [2–4], также анализировавших результаты исследования гемограммы у 233 доноров, полученных на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC [21].

Таким образом, РИ количества лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы не зависят от пола, и для взрослого населения могут быть рассчитаны единые РИ.

Таблица 2

Среднее значение (X), стандартное отклонение (SD) количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы у взрослого населения Астраханской области, РИ, полученные нами и указанные в справочной литературе

Показатель	X	SD	РИ, полученные нами	РИ, указанные в справочной литературе
				[1–3, 19, 20]
WBC, $\times 10^9/\text{л}$	5,91	1,29	3,38–8,44	4–8,8
Neut, $\times 10^9/\text{л}$	3,43	0,96	1,55–5,31	1,8–7,7
Lymph, $\times 10^9/\text{л}$	1,83	0,40	1,05–2,61	1–4,5
Mono, $\times 10^9/\text{л}$	0,57	0,13	0,32–0,82	0–0,8
EO, $\times 10^9/\text{л}$	0,14	0,12	0–0,38	0–0,45
Baso, $\times 10^9/\text{л}$	0,03	0,017	0–0,06	0–0,2
Neut, %	57,0	9,71	38–76	45–75
Lymph, %	30,13	4,4	21,5–38,8	25–55
Mono, %	9,37	1,61	6,2–11	0–12
EO, %	1,92	1,09	0–4,06	1–5
Baso, %	0,51	0,32	0–1,14	0–2
IG, $\times 10^9/\text{л}$	0,004	0,0065	0–0,017	0–0,06
IG, %	0,03	0,06	0–0,15	0–0,6

В нашем исследовании выборка референтной группы была 375 человек (140 мужчин и 235 женщин), и распределение значений было «нормальным», и согласно CLSI C28-A3 [11] РИ лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы был рассчитан и представлен в виде $X_{\text{cp}} \pm 1,96SD$. РИ в виде $X_{\text{cp}} \pm 1,96SD$ указывает на то, что у 95% здоровых лиц наблюдаются значения количества лейкоцитов и показателей лейкоформулы в пределах нормы, а 5% здоровых лиц имеют отклонения от нормы.

Сопоставить полученные нами РИ количества лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы с указанными в справочной литературе [1–3, 19, 20, 21] не представляется возможным, так как РИ получены на разных популяциях, разных выборках, разных методиках исследования.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

- средние значения количества лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы не зависят от пола;
- установленные интервалы лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы могут быть использованы в качестве референтных в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии (г. Астрахань), так как они были разработаны с учетом всех особенностей формирования референтных групп и стандартизацией всех этапов лабораторных исследований;
- приведенные нами интервалы лейкоцитов и показателей лейкоцитарной формулы могут быть использованы как референтные в лабораториях Астраханской области при работе на аналогичных аналитических системах, в частности на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT 2000i.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Тарасову Д.Г., Шашину С.А. за помощь в организации исследования.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алан Г.Б. *Клиническое руководство Тиза по лабораторным тестам*. М.: Лабора; 2013.
2. Казакова М.С., Луговская С.А., Долгов В.В. Референтные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 6: 43–9.
3. Кишкун А.А. *Руководство по лабораторным методам диагностики*. М.: ГЭОТАР-медиа; 2007.
4. Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г. Значение незрелых гранулоцитов в диагностике инфекционно-воспалительных процессов у кардиохирургических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 5: 25–40.
18. Петрова О.В., Тарасов Д.Г., Захарова Л.Р. Опыт внедрения ЛИС PSM в клинико-диагностической лаборатории. *Поликлиника*. 2011; 4(2): 36–7.
21. Казакова М.С., Луговская С.А. Референтные интервалы при применении современных гематологических анализаторов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 9: 10–11.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Alan H.B. Tietz clinical guide to laboratory tests. Moscow: Labora; 2013. (in Russian)
- Kazakova M.S., Lugovskaya S.A., Dolgov V.V. Reference interval of indicators of the total blood analysis of the adult working population. *Clinical laboratory diagnostics. Russian journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2012; 6: 43–9. (in Russian)
- Kishkun A.A. *Guide to laboratory methods of diagnostics*. Moscow: GEOTAR-media; 2007. (in Russian)
- Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G. Value of unripe granulocytes in diagnostics of infectious and inflammatory processes at cardiac patients. *Clinical laboratory diagnostics. Russian journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 5: 25–40. (in Russian)
- Shaw J.L., Cohen A., Konforte D., Binesh-Marvasti T., Colantonio D.A., Adeli K. Validity of establishing pediatric reference intervals based on hospital patient data: a comparison of the modified Hoffmann approach to CALIPER reference intervals obtained in healthy children. *Clin. Biochem.* 2014; 47(3): 166–72. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.008.
- Ridefelt P., Hellberg D., Aldrimer M., Gustafsson J. Estimating reliable pediatric reference intervals in clinical chemistry and haematology. *Acta Paediatr.* 2014; 103(1): 10–5. doi: 10.1111/apa.12438.
- Sinclair L., Hall S., Badrick T. A survey of Australian haematology reference intervals. *Pathology*. 2014; 46(6): 538–43. doi: 10.1097/PAT.0000000000000148.
- Bosco Gahutu J. Clinical chemistry reference intervals in a Rwandan population. *Br. J. Medicine Medical Res.* 2013; 3(3): 532–42. doi: 10.9734/bjmmr/2013/2741.
- Henry E., Christensen R.D. Reference intervals in neonatal hematology. *Clin. Perinatol.* 2015; 42(3): 483–97. doi: 10.1016/j.clp.2015.04.005.
- Zierk J., Arzideh A., Haeckel R., Rascher W., Rauh M., Metzler M. Indirect determination of pediatric blood count reference intervals. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(4): 863–72. doi: 10.1515/cclm-2012-0684.
- Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. CLSI C28-A3. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008. Available at: <http://www.clsi.org>
- Bertholf R.L. Statistical methods for establishing and validating reference intervals. *Lab. Medicine*. 2006; 37(5): 306–10. doi:10.1309/cbmn-prfn-lu1x-a4xv.
- Bolann B.J. Easy verification of clinical chemistry reference intervals. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(11): e279–81. doi:10.1515/cclm-2013-0356.
- Daly C.H., Liu X., Grey V.L., Hamid J.S. A systematic review of statistical methods used in constructing pediatric reference intervals. *Clin. Biochem.* 2013; 46(13–14): 1220–27. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.05.058.
- Blankenstein M.A. Reference intervals – eves met a normal person? *Ann. Clin. Biochem.* 2015; 52(Pt 1): 5–6. doi: 10.1177/0004563214561503. Available at: <http://www.acb.sagepub.com>
- Katayev A., Balciza C., Seccombe D.W. Establishing reference intervals for clinical laboratory test results: is there a better way? *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133(2): 180–6. doi: 10.1309/ajcpn5bmtsf1edyp.
- Horowitz G.L. Estimating reference intervals. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133(2): 175–7. doi: 10.1309/AJCPQ4N7BRZQVHAL.
- Petrova O.V., Tarasov D.G., Zakharova L.R. Experience of introduction of LIS PSM in cliniko-diagnostic laboratory. *Poliklinika*. 2011; 4(2): 36–7. (in Russian)
- Melzer S., Zachariae S., Bocsi J., Engel C., Löffler M., Tarnok A. Reference intervals for leukocyte subsets in adults: Results from a population-based study using 10-color flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2015; 88(4): 270–81. doi: 10.1002/cyto.b.21234.
- Lim E.M., Cembrowski G., Cembrowski M., Clarke G. Race-specific WBC and neutrophil count reference intervals. *Int. J. Lab. Hematol.* 2010; 32(6, Pt 2): 590–7. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01223.x.
- Kazakova M.S., Lugovskaya S.A. Reference interval of indicators of the total blood analysis at use of the automatic hematology analyzer. *Clinical laboratory diagnostics. Russian journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 9: 10–1. (in Russian)

Поступила 23.11.15
Принята к печати 12.05.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.153.979.733-036.11-092:612.015.341:575.08

Лучинина Ю.А.¹, Гончарова М.В.¹, Сурин В.Л.¹, Иващенко Т.Э.²,
Пустовойт Я.С.¹, Карпова И.В.¹, Кравченко С.К.¹

АССОЦИАЦИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ С КЛИНИЧЕСКИМ ПРОЯВЛЕНИЕМ ОСТРОЙ ПЕРЕМЕЖАЮЩЕЙСЯ ПОРФИРИИ

¹ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», 199034, г. Санкт-Петербург, Россия

Острая перемежающаяся порфирия (ОПП) обусловлена частичным дефицитом порфобилиноген-дезаминазы (ПБГД), одного из ферментов цепи биосинтеза гема. Пенетрантность мутантного гена ПБГД невысока и составляет в среднем 10–15%. Какие-либо дополнительные генетические факторы, сочетание которых с мутантным аллелем гена ПБГД приводит к клиническому проявлению ОПП, в настоящее время не известны. Изучена возможная ассоциация аллельных вариантов генов фазы 1: *CYP1A1* (A2455G), *CYP2E1* (G-1259C) и четырех генов фазы 2: *NAT2* (C481T, G590A G857A), *mEPHX1*: Tyr113His – 3-й экзон, His139Arg – 4-й экзон, *GSTM1* (Del), *GSTT1* (Del) с клиническим проявлением ОПП. Установлено, что гомозиготное носительство «быстрого» аллеля гена ацетилтрансферазы (генотип N/N) ассоциировано с латентным течением заболевания. Сочетание «функционально ослабленных» генотипов глутатион-трансфераз класса T и M (*GSTT10/0*, *GSTM10/0*) можно рассматривать как неблагоприятный генетический фактор, связанный с клиническим проявлением ОПП. Сравнительный анализ частот генотипов и полиморфных аллелей генов *CYP1A1*, *CYP2E1* и *mEPHX1* не выявил статистически значимых различий между выборками больных ОПП и асимптомных носителей заболевания.

К л ю ч е в ы е с л о в а : острые печеночные порфирии; acute porphyria hepatica; система детоксикации; бессимптомное носительство генетических заболеваний.

Для цитирования: Лучинина Ю.А., Гончарова М.В., Сурин В.Л., Иващенко Т.Э., Пустовойт Я.С., Карпова И.В., Кравченко С.К. Ассоциация аллельных вариантов генов системы детоксикации с клиническим проявлением острой перемежающейся порфирии. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 156–160. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-156-160

Luchinina Yu.A.¹, Goncharova M.V.¹, Surin V.L.¹, Ivashchenko T.E.², Pustovoyt Ya.S.¹, Karpova I.V.¹, Kravchenko S.K.¹

ASSOCIATION OF ALLELIC VARIANTS OF GENES OF DETOXIFICATION SYSTEM WITH CLINICAL PRESENTATION OF ACUTE INTERMITTENT PORPHYRIA

¹National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation;

²The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology n.a. D.O. Ott, St-Petersburg, 199034, Russian Federation

Acute intermittent porphyria (AIP) is caused by the partial deficiency of porphobilinogen deaminase (PBGD), one of the enzymes of the heme biosynthetic pathway. The penetrance of the mutant gene PBGD is not high and averages of 10–15%. Any additional genetic factors, the combination of which with the mutant allele of the PBGD gene leads to the clinical manifestation of AIP is not currently known. The eventual associations of allelic variants

of genes of the Phase 1: *CYP1A1* (A2455G), *CYP2E1* (G1259C) and four genes of the phase 2: *NAT2* (C481T, G590A G857A), *mEPHX1*: Tyr113His – 3rd exon, His139Arg – 4th exon, *GSTM1* (Del), *GSTT1* (Del) with clinical presentation of AIP were investigated. Homozygous carriership of the “fast” allele of the acetyltransferase gene (genotype N/N) was established to be associated with a latent course of the disease. The combination of “functionally weakened” genotypes of glutathione transferase (class t~) and class M (*GSTT10/0*, *GSTM10/0*) can be considered as an unfavorable genetic factor related with the clinical presentation of AIP. Comparative analysis of the frequencies of genotypes and polymorphic alleles of genes *CYP1A1*, *CYP2E1* and *mEPHX1* revealed no statistically significant differences between the samples of patients with AIP and asymptomatic carriers of the disease.

Key words: acute porphyria hepatica; detoxification system; asymptomatic carriers of genetic diseases.

For citation: Luchinina Yu.A., Goncharova M.V., Surin V.L., Ivashchenko T.E., Pustovoyt Ya.S., Karpova I.V., Kravchenko S.K. Association of allelic variants of genes of detoxification system with clinical presentation of acute intermittent porphyria. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(3): 156-160. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-156-160

Funding. Present study was supported by the Grant of the Russian Foundation of Basic Research “Molecular genetic mechanisms of the pathogenesis of acute hepatic porphyria” (project No 09-04-00456).

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

Received 31 March 2016

Accepted 17 July 2016

Острая перемежающаяся порфирия (ОПП) – редкое наследственное заболевание, обусловленное дефицитом фермента порфириногендезаминазы (ПБГД), катализирующего 3-ю стадию цикла биосинтеза гема. Клинически ОПП чаще всего проявляется после достижения пубертатного возраста. В мире известны единичные случаи заболевания детей, и все они связаны с гомозиготностью или смешанной гетерозиготностью (компаунды) по дефектному гену [1], в то время как взрослые за редчайшими исключениями являются гетерозиготными носителями. Заболевание имеет приступообразное течение, провоцируемое одним или сочетанием нескольких порфириногенных факторов экзогенной или эндогенной природы. К ним относят алкоголь, некоторые лекарственные препараты (нестероидные противовоспалительные, барбитураты, сульфаниламиды и др.), репродуктивная функция у женщин, инсоляция, гипогликемия, бактериальные и вирусные инфекции (например, гепатит). Своевременная точная диагностика и адекватная терапия позволяют спасти подавляющее большинство больных. В период развернутых острых проявлений заболевания, как правило, удается установить правильный диагноз ОПП, основываясь на клинических признаках и биохимической диагностике. Что же касается асимптомных носителей, то для них даже биохимическая диагностика, основанная на измерении активности ПБГД в эритроцитах, далеко не всегда дает однозначный ответ на вопрос о носительстве заболевания, поскольку диапазоны уровней активности фермента у таких пациентов перекрываются с нормальными значениями. Поэтому особое значение приобретает молекулярно-генетическое исследование, позволяющее выявлять латентных, асимптомных носителей дефектного гена, потенциально имеющих риск развития клинической стадии заболевания.

ОПП, имея доминантный характер наследования, характеризуется невысокой пенетрантностью (по максимальным оценкам до 10–15%), свидетельствующей о том, что мутация в гене *ПБГД* является необходимым, но недостаточным условием клинического проявления болезни, основная тяжесть которого связана не с дефицитом продукта ферментативной реакции, катализируемой ПБГД, а с накоплением избытка токсичного субстрата-предшественника. Поскольку снижение активности ПБГД на 50% за счет мутантного аллеля не является достаточным основанием для образования патологического фенотипа, должны существовать какие-то дополнительные генетические факторы, предопределяющие клиническое проявление ОПП у гетерозиготных носителей мутантного гена. Интенсивные исследования в области молекулярной генетики острых порфирий ведутся во многих странах мира. Однако многие авторы отмечают неполноценность современного медико-генетического консультирования острых порфирий из-за невозможности дифференцированного подхода к асимптомным носителям заболевания и выделения среди них каких-либо групп риска. Это обусловлено

отсутствием информации о дополнительных генетических факторах, сонаследующихся с мутантными генами и принципиально влияющих на патогенез заболевания. Такие факторы в настоящее время обнаружены только для двух доминантно наследуемых порфирических нозологий, не относящихся к острым порфириям, – эритропротической протопорфирии (ЭПП) и поздней кожной порфирии (ПКП) [2]. Для ЭПП показана определяющая роль в формировании клинического фенотипа сонаследования мутантного гена феррохелатазы с полиморфным аллелем этого же гена дикого типа (полиморфизм T/C в позиции 48 интрона 3), в котором активирован криптический акцепторный сайт сплайсинга, генерирующий aberrantную лабильную мРНК [3, 4]. Для ПКП показано участие в патогенезе совместного наследования мутантных аллелей основного гена уропорфириногендекарбоксилазы и распространенного мутантного варианта *C282Y* гомохроматозного гена *HFE* [5], а также полиморфизма *Thr461Asp* в гене *CYP1A1* [6] и генотипа A/A по C/A-полиморфизму в интроне 1 гена *CYP1A2* [7]. Ни для одной из острых печеночных порфирий, к которым, кроме ОПП, относят врожденную копропорфирию и вариегатную порфирию, никаких дополнительных генетических факторов не выявлено.

Как уже говорилось выше, для развития клинической картины ОПП помимо наличия мутации в гене *ПБГД* необходимо воздействие по крайней мере одного из ряда провоцирующих факторов, имеющих экзогенную или эндогенную природу. При этом порфириногенные факторы столь многочисленны и разнообразны, что любой человек сталкивается с теми или иными из них достаточно часто. Поэтому объяснить асимптомное носительство ОПП, которое может продолжаться в течение всей жизни человека, тем, что он с этими факторами не сталкивался, вряд ли возможно. По всей вероятности, в случае ОПП, так же как для ЭПП и ПКП, помимо наличия основной мутации в гене *ПБГД* должны существовать дополнительные генетические детерминанты, влияющие на развитие заболевания. Ранее нами было показано, что пенетрантность ОПП не связана с механизмом сонаследования мутантного и функционально ослабленного аллелей гена *ПБГД* [8]. В различных исследованиях последних лет показано, что практически все широко распространенные заболевания, включая почти 90% от всех онкологических заболеваний, в той или иной степени связаны с неблагоприятными внешними факторами. В зависимости от особенностей генома разные индивидуумы могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам [9, 10]. Поскольку провоцирующими факторами клинического проявления ОПП являются многие лекарственные препараты, химические вещества, алкоголь, в детоксикации которых принимают участие различные ферменты, мы предположили, что изучение полиморфизмов генов системы детоксикации поможет объяснить очевидные индивидуальные различия в отношении пенетрантности заболевания.

Кроме этого, исследование полиморфизмов генов детоксикации представляется целесообразным, если учитывать тот факт, что клинический фенотип заболевания проявляется вследствие накопления избытка порфиринов и их предшественников в организме человека, которые, возможно, могут являться эндогенными субстратами для ферментов, задействованных в системе детоксикации.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния функциональных полиморфизмов двух генов фазы 1 системы детоксикации (*CYP1A1*, *CYP2E1*) и четырех генов фазы 2 (*NAT2*, *mEPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*) на клиническое проявление ОПП. Выбор такого спектра генов системы детоксикации определялся широким диапазоном действия кодируемых ими ферментов и их активным

Для корреспонденции:

Сурин Вадим Леонидович, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: vadsurin@mail.ru.

For correspondence:

Surin Vadim L., senior researcher of the Laboratory of Genetic Engineering, National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: vadsurin@mail.ru.

Information about authors:

Luchinina Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-9854-4991>; Goncharova M.V., <http://orcid.org/0000-0003-1741-224X>; Surin V.L., <http://orcid.org/0000-0002-1890-4492>; Ivashchenko T.E., <http://orcid.org/0000-0002-5133-5543>; Pustovoyt Ya.S., <http://orcid.org/0000-0003-1618-6981>; Karpova I.V., <http://orcid.org/0000-0003-0924-2957>; Kravchenko S.K., <http://orcid.org/0000-0001-9086-8521>.

Таблица 1

Праймерные системы и рестрикционные эндонуклеазы, использованные для исследования генов детоксикации

Ген	Полиморфизм	Сочетание праймеров	Размер ПЦР-продукта	Эндонуклеаза, рестрикции
<i>CYP1A1</i>	A2455G (Ile462Val)	F:GAACTGCCACTTCAGCTG TCT/R:GAAAGACCTCCCAGCGGTCA	187 пн	Hinc II
<i>CYP2E1</i>	G(-1259)C	D:CCAGTCGAGTCTACATTGTCA/R:TTCATTCTGTCTTCTAACTGG	410 пн	RsaI
<i>NAT2</i>	C481T (Leu 161 Phe) G590A (Arg 197 Gln) G857A (Gly 286 Glu)	F:GCTGGGTCTGGAAGCTCCTC/R:TTGGGTGATACATACACAAGGG	547 пн 547 пн 547 пн	KpnI TaqI BamHI
<i>mEPHX1</i> экзон 3	T337C (Tyr113His)	F:GATCGATAAGTTCCTGTTTACC/R:ATCCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT	162 пн	EcoR V
<i>mEPHX1</i> экзон 4	A415G (His139Arg)	F:ACATCCACTTCATCCACGT/R:ATGCCTCTGAGAAGCCAT	210 пн	Rsa I
<i>GSTM1</i>		F:GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC/R:GTTGGGCTCAAATATACGGTGG	271 пн	
<i>GSTT1</i>		F:TTCCTTACTGGTCTCACATCTC/R:TCACCGGATCATGGCCAGCA	315 пн	

вовлечением в детоксикацию многих агентов экзогенной (промышленные загрязнители, фармакологические препараты, алкоголь) и эндогенной (гормоны, вирусные инфекции) природы.

Материал и методы

В исследование включены 60 больных ОПП и 36 асимптомных носителей заболевания. Образцы ДНК выделяли из ядерных клеток периферической крови после селективного лизиса эритроцитов 0,8% раствором хлорида аммония по стандартной методике, включающей обработку додецилсульфатом натрия (0,5%) и протеиназой К (200 мкг/мл) в течение 16–18 ч при температуре 37°C с последующей фенольной экстракцией. Полученные образцы ДНК использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для последующего анализа полиморфизмов генов системы детоксикации: *CYP1A1*, *CYP2E1*, *NAT2*, *mEPHX1*, *GSTM1* и *GSTT1*. ПЦР проводили в стандартной смеси (25 мкл), содержащей 20 мМ трис-НСl, рН 8,9, 15 мМ сульфат аммония, 170 мкг/мл BSA, смесь dNTP (200 мкМ по каждому), 2 мМ хлористый магний, по 15 пмоль каждого из праймеров (табл. 1) и 2 ед. активности Taq-полимеразы ("Promega", США).

На основе данных, полученных методом ПЦР, была изучена частота гомозигот по нулевому аллелю *GSTM1* и *GSTT1* среди больных ОПП и асимптомных носителей мутаций. Наличие нормального аллеля «+» определялось присутствием на электрофореграммах продукта амплификации размером 271 пн для *GSTM1* и фрагмента 315 пн для *GSTT1*. Отсутствие соответствующих фрагментов указывало на гомозиготность индивида по делециям. Гомозиготы (+/+) и гетерозиготы (0/+) в наших экспериментах не различались. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена *CYP1A1*.

Для определения полиморфных вариантов генов *NAT2*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *mEPHX1* продукты ПЦР подвергали рестрикционному анализу, который проводили в реакционной смеси (10 мкл), содержащей 5 мкл ПЦР-смеси, 1 мкл 10-кратного буфера, поставляемого вместе с ферментом, 3 мкл воды и 2 ед. активности соответствующей рестрикционной эндонуклеазы (см. табл. 1) фирмы «Сибэнзим» в объеме 1 мкл. Продукты гидролиза анализировали при помощи электрофореза (ЭФ) в 6% ПААГ. Олигонуклеотидные праймеры синтезировали в ЗАО «Синтол» (Москва).

Для статистического анализа использовали стандартный метод χ^2 (пакет программного обеспечения Statistica version 6.0, "Stat-Soft", США).

Результаты

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы 1 системы детоксикации ксенобиотиков

Ген *CYP1A1*. Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей полиморфизма A2455G (Ile462Val) гена *CYP1A1* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$) между изученными группами. Частоты аллелей S (Val462) и N (Ile 462) составили: 6,7 и 93,3% у больных ОПП; 3,3 и 96,7% в группе асимптомных носителей. Частоты генотипов S/S, S/N и N/N составили: 0; 13,4 и 86,6% у больных ОПП; 0; 6,7 и 93,3% в группе асимптомных носителей.

Ген *CYP2E1*. Вместе с тем сравнительный анализ частот генотипов и аллелей (-1259)G/C полиморфизма гена *CYP2E1* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$). Частоты аллелей C1 (-1259G) и C2 (-1259C) составили: 3,3 и 96,7% у больных ОПП; 5 и 95% в группе асимптомных носителей. Частоты генотипов C1/C1, C1/C2 и C2/C2 составили: 0; 6,7 и 93,3% у больных ОПП; 0; 10 и 90% в группе асимптомных носителей.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы 2 системы детоксикации ксенобиотиков

Ген *NAT2*. Мы провели анализ четырех полиморфных вариантов гена *ариламин-N-ацетилтрансферазы (NAT2)*: одного

«быстрого» (нормального) N-аллеля и трех «медленных» (S)-аллелей, приводящих к снижению ферментативной активности белка: C481T (аллель S1), G590A (аллель S2) и G857A (аллель S3).

При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов гена *NAT2* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей нам удалось выявить статистически значимые различия в частотах генотипов N/N и N/S ацетилтрансферазы ($\chi^2 = 5,3518$; $p = 0,0207$ и $\chi^2 = 4,3689$; $p = 0,0366$ соответственно) (табл. 2).

Следует отметить, что в нашу группу асимптомных носителей также вошли люди до 45 лет и дети, у которых возможно клиническое развитие заболевания в будущем, и это могло отразиться на правильности интерпретации полученных нами результатов. Опираясь на тот факт, что клинически ОПП обычно проявляется после пубертатного возраста и у возрастных носителей (старше 45 лет) первично манифестирует крайне редко, мы разграничили группу асимптомных носителей по возрастному критерию, разбив первоначальную выборку на две подгруппы. К 1-й подгруппе мы отнесли людей старше 45 лет, ко 2-й подгруппе – до 45 лет (см. табл. 2). При сравнении этих подгрупп с группой больных ОПП мы обнаружили статистически значимые различия в распределении генотипа N/N между подгруппой асимптомных носителей, возраст которых старше 45 лет, и группой больных ОПП ($p = 0,0290$, $\chi^2 = 4,7676$). Отсутствие статистически значимых результатов в случае распределения генотипа N/S объясняется, по всей вероятности, резким сокращением исследуемой выборки (в 2 раза) при разбиении группы асимптомных носителей по возрастному критерию. Ко 2-й подгруппе («старшей») относятся 4 из 5 человек, имеющих генотип N/N, и только 1 женщина 36 лет оказалась в 1-й («младшей») подгруппе (см. табл. 2). У этой женщины больными являются ее мать и младшая сестра, имеющие генотип N/S ариламин-N-ацетилтрансферазы. Среди 60 больных ОПП генотип N/N встретился всего один раз у пожилой женщины, пережившей в молодости единственный приступ заболевания.

Ген *mEPHX1*. При анализе частот аллелей и генотипов полиморфизма Tug113His гена *микросомальной эпоксигоксиоразы (mEPHX1)* в подгруппах асимптомных носителей были получены следующие результаты: частоты аллелей S (113His) и N (113Tyr) составили 30 и 70% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет, 26,3 и 73,6%

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей ариламин-N-ацетилтрансферазы (ген *NAT2*) у больных ОПП и асимптомных носителей

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП			
	n	%	n	%	старше 45 лет		до 45 лет	
N/N	1	1,7	5	13,9	4	23,5	1	5,3
N/S	34	58,6	13	36,1	6	35,3	7	36,8
S/S	23	39,7	18	50	7	41,2	11	57,9
Всего ...	58	100	36	100	17	100	19	100
Аллель:								
N	36	31	25	35,7	14	41,2	9	23,7
S	80	69	45	64,3	20	58,8	29	76,3

Таблица 3

Частоты генотипов *GSTT1 0/0* и *GSTM1 0/0* у больных ОПП и асимптомных носителей

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП			
	n	%	n	%	старше 45 лет		до 45 лет	
					n	%	n	%
<i>GSTT1 0/0</i>	12	19,35	3	8,3	1	5,9	2	10,5
<i>GSTT1</i> ⁺	50	80,65	33	91,7	16	94,1	17	89,5
<i>GSTM1 0/0</i>	31	50	17	47,2	8	47,1	9	47,4
<i>GSTM1</i> ⁺	31	50	19	52,8	9	52,9	10	52,6
Всего...	62	100	36	100	17	100	19	100

для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет, 37,1 и 62,9% для больных ОПП; частоты генотипов S/S, S/N и N/N в подгруппах составили: 6,6; 46,7 и 46,7% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет; 10,5; 31,6 и 57,9% для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет; 15,5; 43,2 и 41,3% для больных ОПП. Статистически значимых различий не выявлено ($c^2 = 1,487$; $p > 0,05$).

Также не было выявлено статистически значимых различий между подгруппами больных ОПП и асимптомных носителей при сравнении частот генотипов и аллелей полиморфизма His139Arg микросомальной эпоксидагидролазы ($c^2 = 5,032$; $p > 0,05$). Частоты аллелей F(139His) и N(139Arg) составили 17,6 и 82,4% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет; 18,4 и 81,6% для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет; 19,7 и 80,3% для больных ОПП; частоты генотипов F/F, F/N и N/N в подгруппах составили: 5,9; 23,5 и 70,6% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет; 5,3; 26,3 и 68,4% для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет; 0; 39,3 и 60,7% для больных ОПП.

Гены *GSTT1* и *GSTM1*. Сравнительный анализ частоты делеций (0/0) генов *GSTT1* и *GSTM1* между группой больных ОПП и разными группами асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ($c^2 = 0,6621$; $p > 0,05$ и $c^2 = 0,001571$; $p > 0,05$ соответственно). Результаты анализа частот встречаемости гомозигот *GSTT1 0/0* и гомозигот *GSTM1 0/0* у больных ОПП и асимптомных носителей представлены в табл. 3.

Также мы провели анализ по сочетанному распределению нормальных и мутантных аллелей генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных ОПП и асимптомных носителей. Все индивидуумы были разделены на четыре группы: 1) генотипы *GSTT1*⁺, *GSTM1*⁺; 2) генотипы *GSTT1*⁺, *GSTM1 0/0*; 3) генотипы *GSTT1 0/0*, *GSTM1*⁺; 4) генотипы *GSTT1 0/0*, *GSTM1 0/0* (табл. 4). При этом у 6 человек с сочетанием генотипов *GSTT1 0/0*, *GSTM1 0/0*, был известен провоцирующий порфириногенный фактор, из них у 3 это были лекарства, у 1 – инфекция, у 1 – красители, и только у 1 пациентки болезнь была вызвана менструальной функцией. Однако мы не обнаружили статистически значимых различий между выборками больных и асимптомных носителей ОПП при сравнении возможных комбинаций данных генотипов ($c^2 = 1,403$; $p > 0,05$).

Обсуждение

Ассоциация пенетрантности ОПП и частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы I системы детоксикации ксенобиотиков: *CYP1A1* и *CYP2E1*

Цитохромы P450 играют важную роль в метаболизме порфиринов и, следовательно, могут влиять на патогенез печеночных порфирий. Возможная роль полиморфных вариантов генов, кодирующих арилуглеводородкарбоксылазу (*CYP1A1*) и микросомальную монооксигеназу (*CYP2E1*), заключается в том, что они могут индуцировать манифестацию ОПП посредством изменяющейся ферментативной активности с наиболее высоким производством реактивных интермедиатов, ингибирующих порфобилиногендезаминазу.

Арилуглеводородкарбоксылаза, кодируемая геном *CYP1A1*, участвует в метаболизме многих лекарственных средств, полициклических ароматических углеводородов и эстрогенов, осуществляя гидроксилирование эстрадиола, что приводит к его активации [11]. Однако сравнительный анализ частот генотипов и аллелей полиморфизма A245G (Ile462Val) гена *CYP1A1* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий между изученными группами, что позволяет предположить отсутствие ассоциации между данным геном и клиническим проявлением ОПП.

В свою очередь изофермент цитохрома P450 (*CYP2E1*) является ключевым в микросомальной этанолаксилирующей системе

Таблица 4

Частоты сочетаний генотипов *GSTT1* и *GSTM1* у больных ОПП и асимптомных носителей

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП			
	n	%	n	%	старше 45 лет		до 45 лет	
					n	%	n	%
<i>GSTT1</i> ⁺ , <i>GSTM1</i> ⁺	25	40,3	16	44,4	8	47,1	8	42,1
<i>GSTT1</i> ⁺ , <i>GSTM1 0/0</i>	25	40,3	17	47,2	8	47,1	9	47,4
<i>GSTT1 0/0</i> , <i>GSTM1</i> ⁺	6	9,7	3	8,4	1	5,8	2	10,5
<i>GSTT1 0/0</i> , <i>GSTM1 0/0</i>	6	9,7	0	0	0	0	0	0
Всего...	62	100	36	100	17	100	19	100

(МЭОС) и экспрессируется главным образом в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов [12]. Показано, что МЭОС метаболизирует четверть этанола, поступающего в организм [13]. Различные исследования, посвященные анализу полиморфных вариантов гена *CYP2E1*, показывают индивидуальные и популяционные различия в чувствительности (толерантности) к алкоголю [14]. Исследование полиморфизмов данного гена в нашем случае представляло интерес, поскольку алкоголь, который является субстратом для *CYP2E1*, может провоцировать клиническую манифестацию ОПП. Наши предположения о возможной ассоциации данного гена с пенетрантностью ОПП не оправдались, как и в предыдущем случае, полиморфизм гена *CYP2E1* оказался неинформативным (различия частот генотипов и аллелей по данному гену между выборками больных ОПП и асимптомных носителей были статистически незначимы).

Ассоциация пенетрантности ОПП и частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы 2 системы детоксикации ксенобиотиков: *NAT2*, *mEPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*

Полученные данные дают основание предполагать, что генотип N/N арилмин-N-ацетилтрансферазы (ген *NAT2*) может служить фактором благоприятного прогноза в предсказании пенетрантности ОПП.

Эпоксидагидролазы (ген *mEPHX1*) осуществляют промежуточный этап детоксикации, присоединяя воду к образованным цитохромом P450 эпоксидам, превращающимся в трансгидродиоли и далее, под действием других ферментов, в конъюгаты с глюкуроновой кислотой и глутатионом [12, 15]. Различный уровень ферментативной активности обусловлен однонуклеотидными заменами в экзоне 3 – мутация T337C (Tyr113His), «медленная» форма, генотип S/S, и в экзоне 4 – мутация A415G (His139Arg), «быстрая» форма, генотип N/N. Для данного гена также не обнаружено взаимосвязи между частотами аллелей и генотипов и клиническим проявлением ОПП ($p > 0,05$ для всех исследованных генотипов).

Глутатионтрансферазы (гены *GSTT1*, *GSTM1*) относятся к семейству изоферментов, контролирующим конъюгацию электрофильных молекул ксенобиотиков (например, различных лекарственных средств) или их метаболитов, образовавшихся в процессе фазы 1, с восстановленным глутатионом. Также эти ферменты способны к прямому связыванию с гидрофобными соединениями, такими как гем, билирубин, стероидные гормоны, что позволяет им участвовать во внутриклеточном накоплении и обеспечивать транспорт биологических веществ с ограниченной водорастворимостью. Благодаря каталитической активности и способности к связыванию они участвуют в механизмах защиты клеток от повреждающего действия ксенобиотиков и эндогенных субстанций [16].

При распределении частот генотипов гена *GSTT1* частота «функционально неблагоприятного» генотипа (*GSTT1 0/0*) в группе больных ОПП в 2 раза превышает таковую в объединенной группе асимптомных носителей (см. табл. 3). А при сравнении со «старшей» группой асимптомных носителей разница увеличивается уже в 3 раза. По всей вероятности, несмотря на отсутствие статистически значимых различий, «функционально неполноценные» варианты генов глутатион-S-трансфераз, особенно их «нулевые» варианты, приводящие к отсутствию синтеза соответствующих белковых продуктов, можно рассматривать как один из факторов риска клинического проявления ОПП.

Полученные результаты подтвердили наше предположение о возможном участии «функционально неполноценных» («нулевых») вариантов двух исследованных глутатион-S-трансфераз в патогенезе ОПП. Сочетание нулевых аллелей этих генов встретилось только в группе больных ОПП (см. табл. 4). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, которые в данном случае могли быть не обнаружены в силу малой репрезентативности выборки асимптомных носителей, сочетание генотипов *GSTT1 0/0*, *GSTM1 0/0* мож-

Таблица 5

Частота встречаемости порфириногенных факторов у обследованных больных ОПП

Порфириногенный фактор	Все обследованные больные	Лица, имеющие сочетание генотипов <i>GSTT1 0/0</i> , <i>GSTM1 0/0</i>
Менструация	21	1
Лекарства	11	3
Алкоголь	4	–
Беременность	3	–
Инфекции	3	1
Красители	1	1
Инсоляция	1	–
Стресс	1	–
Неизвестно	16	–
Всего...	61	6

но рассматривать как неблагоприятный генетический фактор в пенетрантности ОПП. Следует отметить, что, несмотря на большое разнообразие порфириногенных факторов, изменение гормонального статуса является преобладающим, а лекарства и инфекции в качестве провоцирующего агента встречаются значительно реже (табл. 5). В силу того, что сочетание редких «нулевых» генотипов глутатион-трансфераз встретилось у пациентов с порфириногенными факторами (лекарствами и инфекцией), можно предположить, что данный фермент задействован в детоксикации именно этих провоцирующих заболевание агентов.

Единственная больная, у которой был обнаружен редкий N/N аллель ацетилтрансферазы, ассоциированный с бессимптомным носительством ОПП, унаследовала от одного из родителей такой же редкий аллель, но уже по сочетанию нулевых генотипов глутатион-трансферазы, предположительно ассоциирующихся с клиническим фенотипом заболевания. Возможно, что именно такое сочетание «хорошего» и «плохого» генов обусловило единственный клинический приступ заболевания, перенесенный ею в молодости.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о вполне заслуженном внимании к исследованию генов детоксикации у больных и асимптомных носителей ОПП. Можно сделать предварительный вывод, что в молекулярных механизмах доминантной фенотипической экспрессии мутантного гена *ПБГД*, определяющего патогенез ОПП, скорее всего, задействованы не единичные гены, а целые группы генов. На данный момент анализ генетического полиморфизма генов арилами-*N*-ацетилтрансферазы и глутатион-трансфераз можно рассматривать в качестве прогностического теста для оценки риска клинического проявления ОПП.

Финансирование. Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект №09-04-00456).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Сурин В.Л., Лучинина Ю.А., Селиванова Д.С., Пустовойт Я.С., Карпова И.В., Пивник А.В. и др. Молекулярно-генетическое исследование острой перемежающейся порфирии в России: мутационный анализ и поиск функциональных полиморфизмов в гене порфобилиногендезаминазы. *Генетика*. 2010; 46(4): 540–52.
- Кукес В.Г. *Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты*. М.: Реафарм; 2004.

- Подымова С.Д. Механизмы алкогольного повреждения печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. 1998; 5: 21–5.
- Артамонов В.В., Любченко Л.Н., Немцова М.В., Залетаев Д.В. Неблагоприятная экология и молекулярные системы проспективной диагностики высокого риска развития онкозаболеваний (на примере рака молочной железы). *Вестник НИИ молекулярной медицины*. 2004; 4: 37–54.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

- Hessels J., Voortman G., Van Der Wagen A., Van Der Elzen C., Scheffer H., Zuijderhoudt F.M.J. Homozygous acute intermittent porphyria in a 7-year-old boy with massive excretions of porphyrins and porphyrin precursors. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2004; 27(1): 19–27.
- Badminton M.N., Elder G.H. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2005; 28(3): 277–86.
- Gouya L., Puy H., Lamoril J., Da Silva V., Grandchamp B., Nordmann Y., et al. Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. *Blood*. 1999; 93(6): 2105–10.
- Gouya L., Puy H., Robreau A.M., Lyoumi S., Lamoril J., Da Silva V., et al. Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. *Hum. Genet.* 2004; 114(3): 256–62.
- Brady J.L., Jackson H.A., Roberts A.G., Morgan R.R., Whatley S.D., Rowlands G.L., et al. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and haemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115(5): 868–74.
- Gardlo K., Selimovic D., Bolsen K., Ruzichka T., Abel J., Fritsch C. Cytochrome P4501A1 polymorphisms in a Caucasian population with porphyria cutanea tarda. *Exp. Dermatol.* 2003; 12(6): 843–8.
- Christiansen L., Bygum A., Jensen A., Thomsen K., Brandrup F., Horder M., et al. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda. *Hum. Genet.* 2000; 107(6): 612–4.
- Surin V.L., Luchinina Yu.A., Selivanova D.S., Pustovoyt Ya.S., Karpova I.V., Pivnik A.V., et al. Molecular genetic study of acute intermittent porphyria in Russia: mutation analysis and functional polymorphisms search in porphobilinogen deaminase gene. *Genetics. Russian journal*. 2010; 46(4): 540–52. (in Russian)
- Nebert D.W. Polymorphisms in drug metabolising enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *A. J. Hum. Genet.* 1997; 60(2): 265–71.
- Nebert D.W., Carvan M.J. 3rd. Ecogenetics: from ecology to health. *Toxicol. Ind. Health*. 1997; 13(2–3): 163–92.
- Badawi A.F., Cavalieri E.L., Rogan E.G. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol. *Metabolism*. 2001; 50(9): 1001–3.
- Kukes V.G. *The metabolism of drugs: clinical and pharmacological aspects*. Moscow: Reafarm; 2004. (in Russian)
- Podymova S.D. The mechanisms of alcoholic liver damage. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology (Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii)*. 1998; 5: 21–5. (in Russian)
- Neafsey P., Ginsberg G., Hattis D., Johns D.O., Guyton K.Z., Sonawane B. Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2009; 12(5–6): 362–88. doi: 10.1080/10937400903158359.
- Artamonov V.V., Lyubchenko L.N., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. The unfavorable environmental conditions and prospective diagnostics of high risk of cancer development by means of molecular systems (for example breast cancer). *Bulletin of the Institute of molecular medicine. Russian journal (Vestnik NII molekulyarnoy meditsiny)*. 2004; 4: 37–54.
- Bolt H.M., Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr. Drug Metab.* 2006; 7(6): 613–28.

Поступила 31.03.16
Принята к печати 12.07.16

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 612.915.31:546.72

Будневский А.В., Цветикова Л.Н., Воронина Е.В., Овсянников Е.С., Жусина Ю.Г., Лабжания Н.Б.

ЭРИТРОФЕРРОН КАК ЭРИТРОИДНЫЙ РЕГУЛЯТОР ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА

ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, 394000, г. Воронеж, Россия

Железо является необходимым элементом жизнедеятельности клеток. Важнейшая роль железа определяется функциями белков, которые содержат этот биометалл: гемоглобин и миоглобин, осуществляющие транспортировку и накопление кислорода; ферменты, участвующие в процессах биологического окисления (цитохром р450); различные пероксидазы и каталазы, поддерживающие окислительно-восстановительный баланс организма. Метаболизм железа является уникальным процессом и регулируется целым рядом белков, обеспечивающих узкий безопасный диапазон содержания железа в клетках. Ключевым регулятором обмена железа на протяжении последних 10 лет считался 25-й-аминокислотный белок гепсидин. Гепсидин контролирует основные потоки распределения железа: абсорбция алиментарного железа в кишечнике, утилизация его макрофагами, фагоцитирующими старые эритроциты, и мобилизация железа из гепатоцитов. В литературе иногда встречался термин «эритроидный регулятор железа», однако долгое время нужный протеин оставался неуловимым. Предполагаемый эритроидный регулятор должен обеспечивать доставку железа в костный мозг за счет подавления экспрессии гепсидина в крови, тем самым увеличивая всасывание железа из энтероцитов и стимулируя высвобождение его из запасов. В недавних исследованиях были доказаны свойства мионектина как регулятора эритроидного железа. Впоследствии этот миокин был переименован в эритроферрон. В отличие от адаптивной роли, эритроферрон может способствовать перегрузке железом у больных тяжелыми наследственными анемиями, а также у пациентов, получавших частые гемотрансфузии. В данной статье мы представляем краткое обсуждение функции эритроферрона, а также рецепторов трансферрина 2 и их роль в обмене железа.

К л ю ч е в ы е с л о в а: эритроферрон; гепсидин; обмен железа.

Для цитирования: Будневский А.В., Цветикова Л.Н., Воронина Е.В., Овсянников Е.С., Жусина Ю.Г., Лабжания Н.Б. Эритроферрон как эритроидный регулятор обмена железа. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 161-163. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-161-163

Budnevskiy A.V., Tsvetkova L.N., Voronina E.V., Ovsyannikov E.S., Zhusina Yu.G., Labzhaniya N.B.

ERYTHROFERRONE AS ERYTHROID REGULATOR OF IRON

Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, 394000, Russian Federation

Iron is an essential element of the cell activity. The most important role of iron is determined by the functions of proteins that contain this metal: hemoglobin and myoglobin that execute the transport and storage of oxygen; enzymes involved in the processes of biological oxidation (cytochrome p450), various peroxidases and catalase supporting redox balance. Iron metabolism being unique process is regulated by a number of proteins, providing a narrow safe range of iron content in the cells. 25-amino acid protein hepcidin in the past 10 years was considered to be a key regulator of iron metabolism. Hepcidin controls main streams of the iron distribution: the absorption of nutritional iron in the intestine, utilization of its macrophages phagocytosing old red blood cells, and iron mobilization from hepatocytes. In the literature there is occurred sometimes the term "erythroid regulator of iron metabolism", however, for the long time the desired protein remained elusive. Proposed erythroid regulator should ensure the delivery of iron to the bone marrow due to suppression of blood expression of hepcidin, thereby increasing the absorption of iron from enterocytes and stimulating the release of its stock. In recent studies there were proved properties of myonectin as a regulator of erythroid iron. Subsequently, this myokine was renamed as erythroferrone. As distinct from the adaptive role erythroferrone may contribute to the iron overload in patients with severe hereditary anemias and in patients receiving frequent blood transfusions. In this paper, we present a brief discussion of functions of erythroferrones, as well as the transferrin receptor 2, and their role in iron metabolism.

Key words: erythroferrone; hepcidin; iron metabolism.

For citation: Budnevskiy A.V., Tsvetkova L.N., Voronina E.V., Ovsyannikov E.S., Zhusina Yu.G., Labzhaniya N.B. Erythroferrone as erythroid regulator of iron. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2016; 61(3): 161-163. DOI:10.18821/0234-5730-2016-61-3-161-163

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 18 March 2016

Accepted 17 July 2016

Для корреспонденции:

Овсянников Евгений Сергеевич, кандидат мед. наук, доцент кафедры факультетской терапии ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, 394000, г. Воронеж, Россия. E-mail: ovses@yandex.ru.

For correspondence:

Ovsyannikov Evgeny S., MD, PhD, associate professor of the Voronezh State Medical University n.a. N.N. Burdenko, Voronezh, 394000, Russian Federation. E-mail: ovses@yandex.ru.

Information about authors:

Budnevskiy A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1171-2746>; Tsvetkova L.N., <http://orcid.org/0000-0001-5212-1005>; Voronina E.V., <http://orcid.org/0000-0002-5403-3356>; Ovsyannikov E.S., <http://orcid.org/0000-0002-8545-6255>; Zhusina Yu.G., <http://orcid.org/0000-0002-6809-9743>; Labzhaniya N.B., <http://orcid.org/0000-0001-9416-0010>.

Железо является одним из 15 важнейших микроэлементов, играющих ключевую роль в созревании и пролиферации клеток [1]. У взрослого человека содержится в среднем от 3 до 5 г железа в организме, большая часть которого связана с гемоглобином. Ежедневная потребность в железе составляет 25 мг, 80% которого расходуется для нужд эритропоэза в костном мозге [1]. Гепатоциты и ретикулоэндотелиальные клетки, включая макрофаги и моноциты, являются основными источниками хранения железа в организме человека. Железо депонируется этими клетками в связанной форме, в виде ферритина [2–4]. Активация ферритина снижается в условиях дефицита железа, делая доступным большее количество железа для обеспечения нормального кровотока. В свою очередь избыток железа провоцирует активацию ферритина и защищает клетки от воздействия цитотоксических свободнорадикальных реакций [3].

Всасывание железа, поступающего с пищей, происходит в энтероцитах тонкого кишечника. Белкам, регулирующим этот процесс, отводится особое внимание. Наиболее значимые из них: дуоденальный цитохром В (DcytB), транспортер двухвалентных металлов (DMT-1), фактор высокого железа (High Fe), гепестин, железо-регуляторные белки IRP (Iron Regulatory Protein) и IRE (Iron Responsive Element), а также главный регулятор гомеостаза железа гепсидин. Синтез железосвязывающих протеинов зависит от потребности организма в микроэлементе. Одним из основных железосвязывающих гликопротеинов является трансферрин [5, 6]. Комплекс трансферрина и железа связывается с рецептором трансферрина 1 (TfR1) на клеточной поверхности, изолируя плазматическую мембрану в цитоплазму и формируя раннюю эндосому. Свободное трехвалентное железо в эндосомах превращается в двухвалентное под воздействием дуоденального цитохрома В (DcytB), затем с помощью транспортера двухвалентных металлов 1 (DMT-1) переносится обратно в цитоплазму [7, 8]. Рецепторы трансферрина экспрессируются большим количеством клеток, включая эритроидные предшественники и энтероциты, потребляющие железо для синтеза гемоглобина. Поглощение железа, связанного с другими белками помимо трансферрина, также имеет большое значение в утилизации железа, особенно при врожденных или приобретенных патологиях, таких как серповидно-клеточная анемия, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, ДВС и гемолиз [9].

При дефиците железа энтероциты активно синтезируют железотранспортные белки до тех пор, пока не произойдет достаточное насыщение плазмы железом. Для созревания функционально полноценных эритроцитов требуется своевременная доставка железа для эритроидных клеток-предшественников. Внеклеточный транспорт железа опосредован таким транспортером, как ферропортин, который в основном экспрессируется на базолатеральной мембране энтероцитов ДПК и плазматической мембране макрофагов. Дефицит железа повышает экспрессию ферропортина, тем самым усиливая экспорт железа в плазму, что способствует подавлению внутриклеточного ферритина и высвобождению большего количества железа [3].

Больше всего железа поступает в костный мозг после кровотечения, гемолиза и других состояний, приводящих к усилению эритропоэза в условиях стресса. Стимуляция эритропоэза усиливает всасывание алиментарного железа и высвобождение железа из запасов. Однако «эритроидный регулятор», модулирующий гомеостаз железа, долгое время не был обнаружен [1].

Значение гепсидина

В 2000–2001 гг. впервые был описан 25-аминокислотный антимикробный белок гепсидин, первоначально обозначенный как LEAP-1 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptide) [10, 11]. Гепсидин является главным медиатором анемии при хронических заболеваниях, а также представляет собой связующее звено между врожденным иммунитетом и метаболизмом железа. Гепсидин подавляет всасывание железа в тонком кишечнике, препятствует его высвобождению из макрофагов, снижая способность костного мозга к усваиванию железа. Это приводит к уменьшению уровня сывороточного железа и снижению насыщения трансферрина железом с последующим развитием железodefицитного эритропоэза. В крови большая часть белка неспецифично связывается с альбумином, меньшая же, по-видимому, активная фракция, специфически связывается с β_2 -макроглобулином, который обеспечивает доставку гепсидина к ферропортину. Индуцируя протеосомальную деградацию ферропортина, гепсидин снижает уровень циркулирующего железа [11]. В свою очередь синтез гепсидина транскрипционно регулируется изменением концентрации циркулирующего железа, уровнем железа запасов и развивающимся воспалением [3]. Такие белки, как BMP (bone morphogenetic proteins), HIF (hypoxia inducible factor), ферритин, трансферрин, ферропортин, HFE (high Fe), белок гемохромато-за входят в состав сложных восходящих и нисходящих сигнальных

путей, регулирующих синтез гепсидина [3]. Любой приобретенный или генетический дефект в одном из этих белков может нарушить гомеостаз железа, приводя к его дефициту или избытку [12]. В исследованиях было выявлено значение BMP6/Smad1/5/8 (Mothers against decapentaplegic homolog 1/5/8) пути в качестве входного пути, транскрипционно регулирующего экспрессию гепсидина [13, 14]. После связывания BMP6 с BMP рецептором и его корецептором HJV (Hemojuvelin) [15], SMAD1/5/8 активируется для фосфорилирования SMAD4 (Mothers against decapentaplegic homolog 4). Далее фосфорилированный SMAD4 и комплекс SMAD1/5/8 локализуется в ядре, чтобы транскрипционно активировать ген гепсидина HAMP (Hepcidin Antimicrobial Peptide) [13, 14]. Фактор некроза опухоли-альфа, гамма-интерферон, интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-6 индуцируют экспрессию ферритина, но ингибируют транскрипцию TfR1 [4]. Было показано, что ИЛ-6 стимулирует транскрипцию гепсидина через JAK/STAT (janus kinase/signal transducers and activators of transcription) [16–19] и BMP/Smad сигнальные пути [20, 21], и ослабление этих путей разрешает анемию хронических заболеваний, подтверждая связь между гепсидином и метаболизмом железа при воспалительных процессах [22, 23].

Эритроидная регуляция железа

На сегодняшний день мало данных о механизмах эритроидной регуляции железа. Предполагаемый эритроидный регулятор обмена железа должен быть независим от уровня железа запасов, усиливать свое влияние при анемии, стимулироваться эритропоэтином, одновременно снижая выработку гепсидина. Переливание крови также должно подавлять его активность. Действительно, анемия, индуцированная у мышей кровопусканиями или гемолизом, оказывала подавляющее действие на гепсидин, а уровень супрессии зависел от функционального состояния эритропоэтина в костном мозге [24, 25]. У здоровых мышей адекватная регуляция эритропоэтина позволяет снизить содержание сывороточного гепсидина в течение одного дня без существенного изменения концентрации железа [26]. На роль эритроидного регулятора железа были предложены два кандидата: фактор дифференцировки роста 15 (GDF15, Growth Differentiation factor 15) и искривленный гомолог белка гастрюляции 1 (TWSG1, Twisted Gastrulation) [27, 28]. Первый продемонстрировал способность подавлять экспрессию гепсидина в сыворотке больного талассемией [27]. Транскриптомный анализ эритропоэза выявил аналогичную способность TWSG1 подавлять экспрессию гепсидина [28]. Доказательства в пользу способности обоих факторов к эритроидной регуляции остаются слабыми. Концентрация GDF15 не коррелирует с концентрацией гепсидина [29]. Даже предложенные в качестве эритроидного регулятора растворимые рецепторы трансферрина 1 снижались при дефиците железа, в условиях усиленного эритропоэза. Соответственно, это предположение также было отвергнуто из-за отсутствия эффектов на абсорбцию железа и экспрессию гепсидина [30, 31].

Очевидно, что в основе определенных эволюционных преимуществ лежат механизмы, обеспечивающие быструю доставку железа и восстановление эритропоэза в условиях кровопотери или гемолиза. Предполагаемый эритроидный регулятор гомеостаза железа мог бы существенно облегчить доставку железа в костный мозг за счет уменьшения концентрации гепсидина в крови, тем самым увеличить всасывание железа и высвобождение его из запасов.

В отличие от адаптивной роли эритроидные регуляторы железа могут способствовать перегрузке железом и развитию осложнений у больных наследственными анемиями с неэффективным эритропоэзом, таких как β -талассемия и врожденная эритропоэтическая порфирия. Этот механизм может быть особенно заметен у пациентов после гемотрансфузий, у которых избыток железа развивается вследствие супрессии синтеза гепсидина и, как результат, ведет к повышенной абсорбции железа [32]. В текущем обзоре мы описываем новый эритроидный регулятор, подавляющий экспрессию гепсидина после стимуляции эритропоэза.

Патофизиология эритроферрона

В 2014 г. в качестве эритроидного регулятора железа был предложен 340-аминокислотный белок эритроферрон [33]. Эритропоэтин стимулирует продукцию эритробластами эритроферрона, подавляющего экспрессию гепсидина, тем самым увеличивая выход железа из макрофагов. У мышей-нокаутсов с «выбитым» геном эритроферрона наблюдалась недостаточно быстрая супрессия гепсидина в ответ на кровотечение. У них также можно было проследить снижение гемоглобина, свидетельствующее о некоем препятствии эритропоэзу [33]. Синтез эритроферрона в селезенке и костном мозге увеличивается при анемии воспаления и способствует мобилизации железа запасов и коррекции анемии [34].

Это может служить доказательством роли эритроферрона как эритроидного регулятора метаболизма железа. Тем не менее ранее

эритроферрон был описан как «миокин» или C1q/TNF-связанный белок, изоформа 15 (CTRP15) [35]. К сожалению, тем же термином «миокин» был назван похожий, но неидентичный белок CTRP5, содержание которого возрастает у мышей с инсулин-резистентностью и в миоцитах с низким уровнем ДНК. Этот 243-аминокислотный белок индуцирует фосфорилирование АМФ-зависимой протеинкиназы и ацетил-КоА карбоксилазы [36]. Концентрация CTRP15/миокина регулируется метаболизмом: снижается во время голодания и повышается после приема пищи [35].

В исследование не были включены костный мозг и селезенка, ткани, где эритропоэтин стимулирует секрецию эритроферрона, не анализировали у мышей блокированный ген мионектина [33].

Таким образом, трудно оценить функции эритроферрона/миокина на основании доступных исследований [37]. Также известно, что выполнение физических упражнений и прием пищи не являются достаточными стимуляторами эритропоэза [37]. Однако предполагается, что миокин, синтезирующийся при физической нагрузке и приеме пищи, повышающий поглощение жирных кислот миоцитами и гепатоцитами, может быть ответственным за синтез миоглобина [33].

Роль растворимых рецепторов трансферрина

Имеются работы, посвященные роли растворимых рецепторов трансферрина 2 в регуляции эритропоэза. У мышей, лишенных генов матриптазы 2 и рецепторов трансферрина 2, развивалась тяжелая анемия [38]. У этих мышей наблюдалась более выраженная экспрессия эритроферрона, чем у мышей той же видовой принадлежности, помещенных в условия стресса для эритропоэза. Похожие результаты отмечены в другом исследовании [39]: у мышей, лишенных генов матриптазы 2 и рецепторов трансферрина 2, содержание эритроцитов было выше, чем у мышей, лишенных только гена матриптазы 2. Позже при анализе костного мозга мышей с дефицитом рецепторов трансферрина 2 также наблюдалось увеличение числа ядросодержащих клеток эритроидного ряда и повышение концентрации эритроферрона как в селезенке, так и в эритроидных клетках-предшественниках [40].

Таким образом, CTRP15, первоначально названный миокином, известный сейчас как эритроферрон, по-видимому, играет две различные регулирующие роли: функции миокина и функцию эритроидного регулятора железа. В целом доказательства в пользу эритроферрона как эритроидного регулятора железа больше, чем у мионектина. Растворимые рецепторы трансферрина 2 также играют определенную регуляторную роль в эритропоэзе, подвывая синтез эритроферрона и, тем самым, активность эритропоэза.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lawen A., Lane D.J. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013; 18(18): 2473–507.
- Chua A.C., Graham R.M., Trinder D., Olynyk J.K. The regulation of cellular iron metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2007; 44(5–6): 413–59.
- Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Andrews N.C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004; 117(3): 285–97.
- Torti F.M., Torti S.V. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 2002; 99(10): 3505–16.
- Gomme P.T., McCann K.B., Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug. Discov. Today.* 2005; 10(4): 267–73.
- Wally J., Halbrook P.J., Vonrhein C., Rould M.A., Everse S.J., Mason A.B., et al. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(34): 24934–44.
- Fleming M.D., Trenor C.C., Su M.A., Foerzler D., Beier D.R., Dietrich W.F., et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* 1997; 16(4): 383–6.
- Fleming M.D., Romano M.A., Su M.A., Garrick L.M., Garrick M.D., Andrews N.C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Nat. L. Acad. Sci. USA* 1998; 95(3): 1148–53.
- Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001; 409(6817): 198–201.
- Krause A., Neitz S., Magert H.J., Schulz A., Forssmann W.G., Schulz-Knappe P., Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000; 480(2–3): 147–50.
- Park C.H., Valore E.V., Waring A.J., Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(11): 7806–10.
- Andrews P. A. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342(17): 1293.
- Meynard D., Kautz L., Darnaud V., Canonne-Hergaux F., Coppin H., Roth M.P. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat. Genet.* 2009; 41(4): 478–81.
- Andriopoulos B., Corradini E., Xia Y., Faasse S.A., Chen S., Grgurevic L., et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat. Genet.* 2009; 41(4): 482–7.
- Babitt J.L., Huang F.W., Wrighting D.M., Xia Y., Sidis Y., Samad T.A., et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* 2006; 38(5): 531–9.
- Pietrangelo A., Dierssen U., Valli L., Garuti C., Rump A., Corradini E., et al. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology.* 2007; 132(1): 294–300.
- Sakamori R., Takehara T., Tatsumi T., Shigekawa M., Hikita H., Hiramatsu N., et al. STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *J. Gastroenterol.* 2010; 45(2): 244–8.
- Wrighting D.M., Andrews N.C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 2006; 108(9): 3204–9.
- Verga Falzacappa M.V., Vujic Spasic M., Kessler R., Stolte J., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood.* 2007; 109(1): 353–8.
- Lin L., Valore E.V., Nemeth E., Goodnough J.B., Gabayan V., Ganz T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood.* 2007; 110(6): 2182–9.
- Steinbicker A.U., Sachidanandan C., Vonner A.J., Yusuf R.Z., Deng D.Y., Lai C.S., et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood* 2011; 117(18): 4915–23.
- Theurl I., Schroll A., Sonnweber T., Nairz M., Theurl M., Willenbacher W., et al. Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. *Blood.* 2011; 118(18): 4977–84. doi: 10.1182/blood-2011-03-345066.
- Ganz T., Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1823(9): 1434–43.
- Pak M., Lopez M.A., Gabayan V., Ganz T., Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 2006; 108(12): 3730–5.
- Vokurka M., Krijt J., Sulc K., Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol. Res.* 2006; 55(6): 667–74.
- Ashby D.R., Gale D.P., Busbridge M., Murphy K.G., Duncan N.D., Cairns T.D., et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica.* 2010; 95(3): 505–8. doi: 10.3324/haematol.2009.013136.
- Tanno T., Bhanu N.V., Oneal P.A., Goh S.H., Staker P., Lee Y.T., et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.* 2007; 13(9): 1096–101.
- Tanno T., Porayette P., Sripichai O., Noh S.J., Byrnes C., Bhupatiraju A., et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood.* 2009; 114(1): 181–6.
- Santini V., Girelli D., Sanna A., Martinelli N., Duca L., Camprotrini N., et al. Hepcidin levels and their determinants in different types of myelodysplastic syndromes. *PLoS. One.* 2011; 6(8): e23109.
- Cazzola M., Beguin Y., Bergamaschi G., Guarnone R., Cerani P., Barella S., et al. Soluble transferrin receptor as a potential determinant of iron loading in congenital anaemias due to ineffective erythropoiesis. *Br. J. Haematol.* 1999; 106(3): 752–5.
- Flanagan J.M., Peng H., Wang L., Gelbart T., Lee P., Johnson Sasu B., Beutler E. Soluble transferrin receptor-1 levels in mice do not affect iron absorption. *Acta Haematol.* 2006; 116(4): 249–54.
- Ramos P., Melchiorri L., Gardenghi S., Van-Roijen N., Grady R.W., Ginzburg Y., Rivella S. Iron metabolism and ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia mouse models. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1202: 24–30. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05596.x.
- Kautz L., Jung G., Valore E.V., Rivella S., Nemeth E., Ganz T. Identification of erythroferone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat. Genet.* 2014; 46(7): 678–84.
- Kautz L., Jung G., Nemeth E., Ganz T. Erythroferone contributes to recovery from anemia of inflammation. *Blood.* 2014; 124(16): 2569–74.
- Seldin M.M., Peterson J.M., Byerly M.S., Wei Z., Wong G.W. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(15): 11968–80. doi: 10.1074/jbc.M111.336834.
- Park S.Y., Choi J.H., Ryu H.S., Pak Y.K., Park K.S., Lee H.K., Lee W. C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(41): 27780–9.
- Gunga H.C., Kirsch K.A., Roecker L., Kohlberg E., Tiedemann J., Steinach M., Schobersberger W. Erythropoietin regulations in humans under different environmental and experimental conditions. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2007; 158(2–3): 287–97.
- Wallace D.F., Secondes E.S., Rishi G., Ostini L., McDonald C.J., Lane S.W., et al. A critical role for murine transferrin receptor 2 in erythropoiesis during iron restriction. *Br. J. Haematol.* 2015; 168(6): 891–901.
- Nai A., Pellegrino R.M., Rausa M., Pagani A., Boero M., Silvestri L., et al. The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by Tmprss6 inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice. *Haematologica.* 2014; 99(6): 1016–21.
- Lane D.J., Lawen A. Non-transferrin iron reduction and uptake are regulated by transmembrane ascorbic acid cycling in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(3): 12701–8.

Поступила 18.03.16

Принята в печать 12.07.16

ЮБИЛЕИ И ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.15:92 Горяев

Абдулганиева Д.И., Бомбина Л.К., Назарова М.Д., Халфина Т.Н.

К 140-ЛЕТИЮ ПРОФЕССОРА Н.К. ГОРЯЕВА

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
420012, г. Казань, Россия

Описан жизненный и профессиональный путь знаменитого профессора Н.К. Горяева. Одной из главных заслуг ученого было создание «камеры Горяева», которую долгие годы широко применяли в нашей стране и за рубежом для подсчета форменных элементов крови.

К л ю ч е в ы е с л о в а: Николай Константинович Горяев; камера Горяева; гематология; селезенка.

Для цитирования: Абдулганиева Д.И., Бомбина Л.К., Назарова М.Д., Халфина Т.Н. К 140-летию профессора Н.К. Горяева. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 164-166. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-164-166

Abdulganieva D.I., Bombina L.K., Nazarova M.D., Khalfina T.N.

ON THE OCCASION OF THE 140TH BIRTHDAY ANNIVERSARY OF THE PROFESSOR N.K. GORYAEV

Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation

In the article there is described the course of life and professional career of the famous Professor Nikolay Konstantinovich Goryaev. One of the main achievements of the scientist was the creation of "Goryaev's camera", which was widely used for many years for counting of blood cells.

К e y w o r d s: Nikolay Konstantinovich Goryaev; Goryaev's camera; hematology; spleen.

For citation: Abdulganieva D.I., Bombina L.K., Nazarova M.D., Khalfina T.N. On the occasion of the 140th anniversary of the birth of the Professor N.K. Goryaev. *Hematology and Transfusiology, Russian journal (Gematologiya i transfusiology)*. 2016; 61(3): 164-166. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-164-166

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 14 Dec 2015

Accepted 11 Feb 2016

Профессор Николай Константинович Горяев является одним из выдающихся ученых-новаторов терапевтической школы первой половины XX века, Героем Социалистического Труда, Заслуженным деятелем науки РСФСР и ТАССР, тружеником тыла в годы Великой Отечественной войны. В 2015 г. Казанский государственный медицинский университет отметил 140-летие со дня рождения великого ученого, одного из основоположников гематологии, внесшего колоссальный вклад в отечественную науку. Широкоизвестную камеру Горяева в нашей стране и за рубежом долгие годы использовали для подсчета форменных элементов крови.

Николай Константинович Горяев родился 12 июня 1875 г. в г. Тюмени в семье мещанина. В 1895 г. Н.К. Горяев был зачислен на медицинский факультет Московского университета. Уже в студенческие годы Николай Константинович заинтересовался морфологией элементов крови, проводя свободное время в гистологической лаборатории И.Ф. Огнева. В 1898 г. Н.К. Горяев за участие в студенческих беспорядках был исключен из университета и выслан из Москвы без права восстановления в университете. Однако благодаря хлопотам ма-

тери в 1899 г. ему разрешили продолжить обучение на медицинском факультете Казанского университета [1].

18 октября 1902 г. Н.К. Горяев получил диплом врача-лекаря с отличием (*medicus cum eximia laude*), в январе 1903 г. его утвердили в должности сверхштатного ординатора факультетской терапевтической клиники [1]. В 1904–1906 гг. во время русско-японской войны Н.К. Горяев работал врачом в Омском военном госпитале. Вернувшись в 1906 г. в Казань, он продолжил заниматься научной работой под руководством проф. А.Н. Казем-Бека. В 1906–1907 гг. Николай Константинович успешно сдал экзамены в докторантуру. Одновременно с работой в клинике он выполнял научную работу в физиологической лаборатории под руководством выдающегося проф. А.Н. Миславского. 6 декабря 1910 г. Николай Константинович защитил диссертацию на степень доктора медицинских наук по теме «Материалы к вопросу о движении и иннервации селезенки». По воспоминаниям современников, физиолог А.Н. Миславский утверждал, что работа Н.К. Горяева была одной из лучших работ, выполненных в его лаборатории.

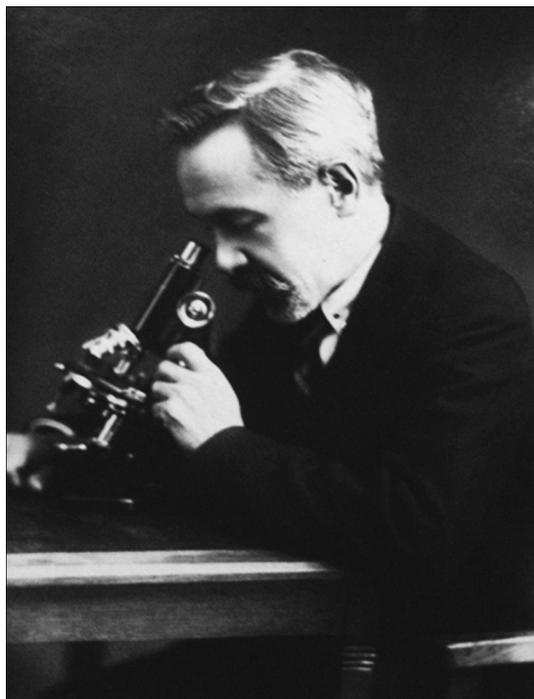
В июне 1911 г. молодого Николая Константиновича отправили на 2 года в образовательную командировку в Австрию и Германию, где он получил возможность слушать лекции и выполнять исследования под руководством виднейших западных ученых-гематологов. В ходе своей поездки Н.К. Горяев проводил научные исследования в лабораториях Х. Шриdde и А. Паппенгейма, а также изучал организацию санаторного дела в Берлине. Опыт заграничной командировки позволил

Для корреспонденции:

Абдулганиева Диана Ильдаровна, доктор мед. наук, заведующая кафедрой госпитальной терапии с курсом эндокринологии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, г. Казань, Россия. E-mail: Diana_s@mail.ru.

For correspondence:

Abdulganieva Diana I., MD, PhD, DSc, Head of the Department of Hospital Therapy with the course of Endocrinology of Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation. E-mail: Diana_s@mail.ru.

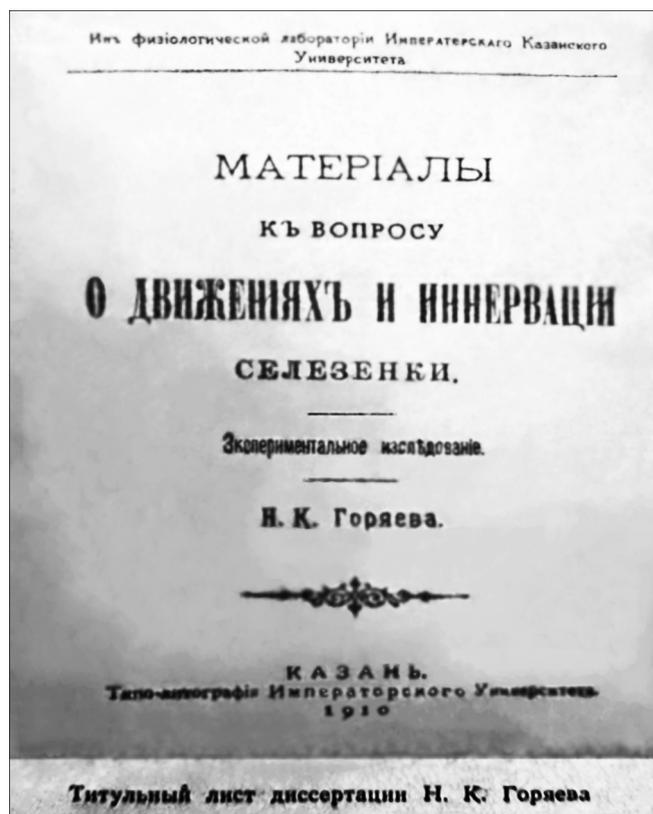


Николаю Константиновичу стать одним из основоположников нового направления в изучении внутренних болезней – гематологии [1, 2].

В 1913 г. Николай Константинович по возвращении из командировки был зачислен приват-доцентом медицинского факультета Казанского государственного университета с поручением чтения курса по клинической гематологии [3].

Почти сразу в 1913 г. вышли его статьи «Случай лимфатической (смешанной) лейкемии», «К вопросу о лейканемии», «Zur Leukanämie frage» [1]. В этот период Н.К. Горяев уделял большое внимание технике и методике выполнения гематологических исследований. Его новаторская деятельность как ученого отразилась в усовершенствовании уже имевшихся камер для подсчета форменных элементов крови. Им была разработана более совершенная камера за счет добавления специальной сетки, получившей название «камеры Горяева» [4]. Благодаря увеличенному объему сетки метод отличался большей точностью подсчета [5]. Первоначально ее выпускала в Германии фирма Лейтса в оригинальной конструкции, а спустя 30 лет ее производство было налажено в России. Камера с сеткой Н.К. Горяева получила широкое распространение в Советском Союзе и странах Центральной и Восточной Европы [1].

Николай Константинович Горяев был не только выдающимся ученым, но и замечательным педагогом. К каждой из своих лекций он тщательно готовился, всегда его лекции сопровождалось клиническим разбором больных и макро/микропрепаратов. В ходе практических занятий он не только разбирал клинические случаи, но и терпеливо обучал технике приготовления мазков, методике подсчета форменных элементов крови. Никогда не жалел времени на то, чтобы научить студентов правильно, методично обследовать пациентов, при клиническом разборе пациентов он уделял пристальное внимание особенностям течения заболевания, объ-



яснял каждое отклонение от обычного его течения.

В 1915 г. Николай Константинович приступил к работе по созданию гематологического атласа. Гематологический атлас Н.К. Горяева был закончен в 1930 г. и подготовлен к печати в Ленинграде с одобрения проф. Г.Ф. Ланга и проф. М.В. Черноуцко, которые ходатайствовали о его публикации. К сожалению, в непротые годы между Первой и Второй мировыми войнами атлас так и не был опубликован [2].

В мае 1920 г. наступил новый этап в жизни проф. Н.К. Горяева – он был избран заведующим кафедрой госпитальной терапии Казанского медицинского университета. В это время гражданской войны и революции кафедра имела всего двух сотрудников помимо Н.К. Горяева, но благодаря его усилиям разрослась в хорошо оборудованную лечебную, учебную и научную базу.

В этот период Н.К. Горяев расширил направления своих научных изысканий: исследовал картины крови у больных легочным туберкулезом на фоне кумысотерапии, занимался вопросами сердечно-сосудистой патологии. Результаты своих исследований изложил в уникальной монографии «Материалы к вопросу о кумысолечении при легочном туберкулезе», статьях «К симптоматологии стеноза выхода аорты», «К вопросу о периферическом сердце» [2].

В течение 10 лет Николай Константинович активно занимался вопросами физиологии, гистологии селезенки, ее патологии при различных состояниях и заболеваниях, вопросами спленэктомии. В 1929 г. вышла его совместная работа с В.М. Сергиевским «К вопросу о роли селезенки в портальном кровообращении», опубликованная в книге «Ученые записки Казанского

университета». В 1930 г. вышла значимая работа, опубликованная не только в России, но и в Германии, – «К микроанатомии селезенки», выполненная при участии знаменитых ученых А.Ф. Самойлова и И.П. Васильева [6, 7].

Одной из завершающих работ в изучении Н.К. Горяевым селезенки стал труд, изданный в 1939 г., «Клиника спленомегалий», в котором рассматривались многочисленные клинические случаи и различные варианты лабораторной и инструментальной диагностики [8].

В 1940 г. Николай Константинович публикует в Казанском медицинском журнале научную работу «К патогенезу врожденной гемолитической желтухи», в которой затрагивает вопросы микросфероцитоза при врожденной желтухе [9]. В этой статье Н.К. Горяев дает обзор мнений клиницистов, известных во всем мире: Негели, Шоффара, Минковского, Эппингера, Томсона, Мейленграхта, Истаманвой и др.

Николай Константинович был не только выдающимся ученым, врачом, но и талантливым организатором. Благодаря Н.К. Горяеву была организована служба переливания крови, которую он возглавлял до последних дней. Николай Константинович входил в состав высшего санитарного совета при Казанском отделе здравоохранения, был председателем терапевтической секции научно-медицинской ассоциации, активно занимался организацией санаторного дела [3].

В тяжелые годы Великой Отечественной войны кафедра госпитальной терапии не прекращала свою работу только благодаря усилиям Н.К. Горяева. Вместе с единственным оставшимся ассистентом В.Н. Смирновым они выполняли огромный труд – осуществляли лечебную работу и поддерживали непрерывный учебный процесс на кафедре. В годы Великой Отечественной войны Николаем Константиновичем было подготовлено множество квалифицированных медицинских кадров для фронта. Война внесла коррективы и в научную деятельность – Н.К. Горяев изучал морфологический состав крови при различных раневых процессах, обосновывал необходимость оперативного вмешательства при септических осложнениях, делал прогнозы об исходах текущего лечения и давал рекомендации для дальнейшего лечения раненых. Каждый день Н.К. Горяев, не жалея собственных сил, консультировал в военных госпиталях раненых солдат, ставил на ноги тяжелобольных. Спал профессор 3–4 часа в сутки, уставая временами до головокружения. И уже в 6 часов утра вставал, чтобы послушать сообщения с фронта, всегда записывал их, чтобы рассказать своим коллегам.

Николай Константинович свято верил в победу. На просьбы родственников не изнурять себя, беречь здоровье он говорил: «Если люди на фронте свои жизни за Родину отдают, то мы обязаны тылу ее отдавать» [1].

Свой последний доклад он прочитал в 1942 г. на научной конференции Казанского государственного медицинского института на тему: «Опыт клинического использования лейкоцитарной картины при сыпном тифе». А за 2 дня до смерти Николай Константинович выступал перед врачами Татарстана. В ночь на 11 июля 1943 г. профессора Н.К. Горяева не стало. Николай Константинович умер от геморрагического инсульта [1].

Похоронен проф. Н.К. Горяев на Арском кладбище г. Казани.

Профессор Н.К. Горяев, несомненно, являлся талантливым гематологом, физиологом, клиницистом, педагогом. Казанская терапевтическая школа гордится своим ученым, возглавлявшим кафедру госпитальной терапии с 1919 по 1943 г., энтузиастом-новатором, усовершенствовавшим исследования в гематологии. Вклад Николая Константиновича в историю развития отечественной лабораторной диагностики огромен и неосценим.

ЛИТЕРАТУРА

1. Билич И.Л. *Профессор Николай Константинович Горяев. Жизненный путь*. Казань; 1971.
2. Созинов А.С., Альбицкий В.Ю., ред. *Казанская терапевтическая школа: от истоков к будущему*. Казань: Медицина; 2014: 108–13.
3. Тергулов А.Г. К жизненному пути профессора Н.К. Горяева. *Труды Казанского государственного Медицинского института*. 1943; 2: 2–12.
4. Ронин В.С., Старобинец Г.М., Утевский Н.Л. *Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований*. М.: Медицина; 1982: 178–83.
5. Горяев Н.К. К методике счисления форменных элементов крови. О моем видоизменении сетки доктора Предтеченского. *Русский врач*. 1914; 6: 191–3.
6. Горяев Н.К. К микроанатомии селезенки. *Казанский медицинский журнал*. 1930; 6: 551–6.
7. Горяев Н.К. О показаниях к спленэктомии. *Казанский медицинский журнал*. 1934; 6: 549–561.
8. Горяев Н.К. К вопросу о клиническом применении торотраста с целью гепатолиенографии. *Казанский медицинский журнал*; 1939; 11–12: 94–9.
9. Горяев Н.К. К патогенезу врожденной гемолитической желтухи. *Труды Казанского государственного медицинского института*. 1940. вып.1: 59–70.

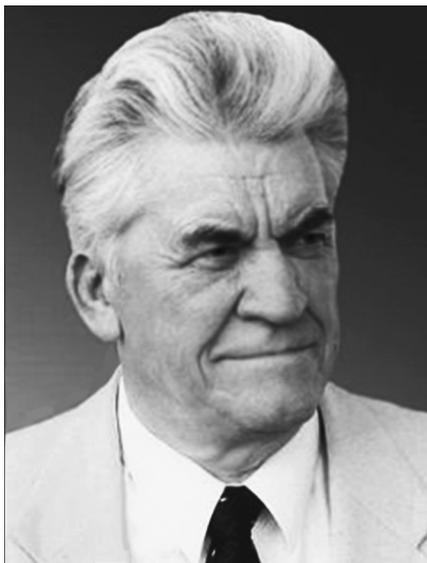
REFERENCES

1. Bilich I.L. *Professor Nikolay Konstantinovich Goryaev. Course of life*. Kazan; 1971. (in Russian)
2. Sozinov A.S., Albitskiy V.Yu., eds. *Kazan therapeutic school: from sources to the future*. Kazan: Meditsina; 2014: 108–13. (in Russian)
3. Teregulov A.G. To a course of life of professor N.K. Goryaev. *Proceedings of the Kazan State Medical Institute. (Trudy Kazanskogo gosudarstvennogo meditsinskogo instituta)*. 1943; 2: 2–12. (in Russian)
4. Ronin V.S., Starobinets G.M., Utevskiy N.L. *The guide to a practical training to methods of clinical laboratory trials*. M.: Meditsina; 1982: 178–83. (in Russian)
5. Goryaev N.K. To a technique of notation of uniform elements of blood. About my modification of a grid of doctor Predtechenskiy. *Russian doctor (Russkii vrach)*. 1914; 6: 191–3. (in Russian)
6. Goryaev N.K. To spleen microanatomy. *Kazan Medical Journal (Kazanskii meditsinskii zhurnal)*. 1930; 6: 551–6. (in Russian)
7. Goryaev N.K. About indications to a splenectomy. *Kazan Medical Journal (Kazanskii meditsinskii zhurnal)*. 1934; 6: 549–61. (in Russian)
8. Goryaev N.K. To the question about the clinical application of torotrast for the purpose of hepatolienography. *Kazan Medical Journal (Kazanskii meditsinskii zhurnal)*. 1939; 11–12: 94–9. (in Russian)
9. Goryaev N.K. To the pathogenesis of congenital hemolytic jaundice. *Proceedings of the Kazan State Medical Institute 1940; Issue 1: 59–70. (in Russian)*

Поступила 14.12.15
Принята к печати 11.02.16

НЕКРОЛОГИ

ПАМЯТИ ВАЛЕНТИНА АНДРЕЕВИЧА ЖУРАВЛЕВА



14 мая 2016 г. скончался Валентин Андреевич Журавлев, профессор, член-корреспондент РАН, Заслуженный врач России, Заслуженный деятель науки России, лауреат Государственной премии России.

Валентин Андреевич родился 23 октября 1931 г. в поселке Черная Холуница Омутнинского района Кировской области. В 1956 г. после окончания Горьковского государственного медицинского института был распределен в медсанчасть г. Ангарск Иркутской области, где работал хирургом.

В 1961 г. он поступил в аспирантуру Кировского научно-исследовательского института переливания крови и стал первым в истории аспирантом этого учреждения. В 1965 г. В.А. Журавлев защитил кандидатскую диссертацию на тему «Хирургическое лечение портальной гипертензии» и был назначен старшим научным сотрудником хирургической клиники. В 1970 г. защитил докторскую диссертацию на тему «Методы резекции и показания к ней при очаговых поражениях печени» и был избран на должность руководителя хирургической клиники.

В 1978 г. Валентин Андреевич стал директором Кировского научно-исследовательского института переливания крови. С этого времени по 1989 г. он являлся директором института и руководителем хирургической клиники. Этот период характеризовался активным развитием хирургии, трансфузиологии, лабораторных исследований. В 1982 г. институт был переименован в Кировский НИИ гематологии и переливания крови, в 1983 г. на базе хирургической клиники открыт зональный Центр хирургии печени Минздрава России. В том же году коллектив инсти-

тута стал коллективом коммунистического труда. В 1986 г. было начато строительство собственного клинично-лабораторного корпуса.

Основное направление научно-практической деятельности проф. В.А. Журавлева – хирургия печени, разработка новых методов хирургического лечения опухолевых заболеваний этого органа. Валентин Андреевич создал школу хирургов-гепатологов, под его руководством подготовлено 7 докторских и 38 кандидатских диссертаций. Им опубликовано свыше 400 научных работ, в том числе 17 монографий, 5 учебников, 10 патентов на изобретения. Ряд книг, написанных В.А. Журавлевым, получили известность в профессиональной среде – «Трансфузиологические операции» (1981), «Осложнения гемофилии» (1984), «Большие и предельно большие резекции печени» (1986), «Очаговые заболевания печени, осложненные механической желтухой», «Радикальные операции у «неоперабельных» больных с очаговыми поражениями печени» (2000).

В.А. Журавлев стал основателем медицинского института в Кирове и первым его ректором. В 1987 г. он возглавил филиал Пермского медицинского института в Кирове, с 1994 по 2002 г. Валентин Андреевич являлся ректором Кировского государственного медицинского института (Кировская государственная медицинская академия). Его имя стоит в ряду лучших представителей Кирова и области, Почетным гражданином которых он являлся.

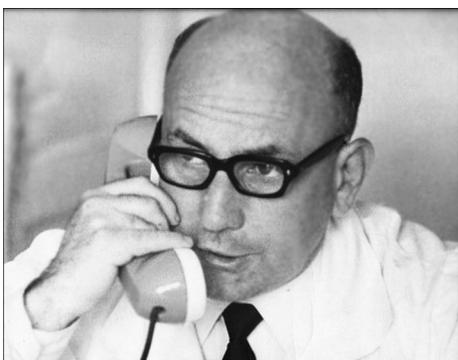
В.А. Журавлев – член-корреспондент Российской академии медицинских наук (1999), почетный член Международной ассоциации хирургов-гепатологов, почетный академик Польской академии медицинских наук (2000), почетный профессор Кировской государственной медицинской академии (2001), почетный профессор Кировского государственного университета (2001). Он награжден орденом Трудового Красного Знамени (1981), удостоен премии Святого апостола Андрея Первозванного (1998).

Валентину Андреевичу не были чужды простые человеческие увлечения: он любил рыбалку, увлеченно играл в шахматы, собирал интересные истории из жизни, которые записывал и с удовольствием рассказывал.

В последние годы Валентин Андреевич тяжело болел. Ушел из жизни выдающийся хирург, руководитель, организатор здравоохранения и просто хороший человек. Светлая ему память.

*Редакционная коллегия журнала
Коллеги и друзья*

ПАМЯТИ ЛЬВА ИОСИФОВИЧА ИДЕЛЬСОНА



Мы, в первую очередь гематологи, понесли тяжелую утрату. Скончался Лев Иосифович Идельсон – один из лучших представителей гематологической школы А.Н. Крюкова – И.А. Кассирского, в ком счастливо сочетались талантливый ученый, прекрасный преподаватель, высокопрофессиональный врач, изумительный человек.

Родился Л.И. Идельсон 6 марта 1930 г. в городе Баку в семье известного врача-терапевта. Баку представлял собой в те годы своеобразный культурный центр, в котором переплетались цивилизации Ирана, России, Кавказа и Закавказья. Оттуда вышло семейство Нобелей, там начинались российская нефтедобыча и нефтепереработка, отсюда же наш выдающийся физик, лауреат Нобелевской премии Л.Д. Ландау.

Окончив среднюю школу, Лев Идельсон, несмотря на то, что хорошо играл на скрипке, выбирает медицину и поступает в медицинский институт. В 1949 г., когда Льву Идельсону было 19 лет, умирает его отец, написавший сыну перед смертью «Я не оставил тебе богатств, но я оставляю тебе чистое незапятнанное имя». И именно щепетильная чистота и незапятнанность более всего характеризуют жизнь и деятельность Л.И. Идельсона.

После окончания института он работал терапевтом в городе Краснозаводске. В 1953 г. был принят в аспирантуру IV кафедры терапии Центрального института усовершенствования врачей, возглавляемую профессором П.И. Егоровым, работавшей на базе Центральной клинической больницы № 1 Министерства путей сообщения. Кандидатская диссертация Льва Иосифовича посвящена определению внутреннего фактора Касла при язвенной болезни желудка. Вскоре после защиты кандидатской диссертации он приходит в академическую группу академика АМН Иосифа Абрамовича Кассирского, где и прошла основная часть его научной, лечебной и педагогической работы (с конца 1960-х годов по 1990 г.). В клинике И.А. Кассирского в то время работал уникальный коллектив энтузиастов, захваченных как научными проблемами, так и практической врачебной работой. Лев Иосифович был одним из самых увлеченных, самых активных и наиболее результативно и плодотворно работающих. Отличительной характеристикой коллектива сотрудников кафедры было то, что это был коллектив врачей-лечебников-гематологов-морфологов, видящих пациента сразу в нескольких измерениях. Подобного нигде в стране не было. Л.И. Идельсон очень быстро воспринял морфологическую систему мышления в научном и лечебно-диагностическом процессе и стал органической частью нового для себя коллектива.

Круг его интересов был широк, но основная часть его научной деятельности всегда была связана с изучением проблем патологии красной крови. Л.И. Идельсоном была создана и многие годы работала под его руководством лаборатория, в которой изучались вопросы патогенеза и лабораторной диагностики различных форм анемии и патологии порфиринового обмена. Он ежедневно работал в ней со своими аспирантами и ординаторами. В 38 лет (1968 г.) он защищает докторскую диссертацию по проблемам нарушения порфиринового обмена, и в этом же году выходит его книга «Нарушения порфиринового обмена в клинике». Результатом

изучения различных форм анемии стали многочисленные статьи, написанные Львом Иосифовичем совместно с коллегами: об ошибках в диагностике V_{12} -дефицитной анемии, об анемиях, связанных с дефицитом активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, о различных формах талассемии, о парциальной красноклеточной аплазии костного мозга и многие другие. В 1975 г. вышла книга «Гемолитические анемии», написанная совместно с Н.А. Дидковским и Г.В. Ермильченко, в 1981 г. – книга «Гипохромные анемии». В «Руководстве по гематологии» под редакцией академика А.И. Воробьева (три издания) Лев Иосифович написал главы о разных формах наследственных и приобретенных анемий, представляющие собой всеобъемлющий фундаментальный труд, который до сих пор является уникальным в отечественной гематологии, служил и еще долго будет служить незаменимым пособием для всех гематологов страны. Как вспоминает академик РАН А.И. Воробьев, «... Главное место Л.И. Идельсона – глава гематологической школы патологии красной крови, которому равных нет».

Но меньше всего Лев Иосифович был похож на кабинетного ученого. Более того, его подход к изучению того или иного вопроса всегда начинался от конкретного клинического наблюдения. Многие его коллеги помнят, как он организовал амбулаторный прием больных в маленьком кабинете на проходной в Центральной клинической больницы № 2 Министерства путей сообщения, куда люди приезжали со всей страны без предварительной записи или направления, и все получали консультацию, причем абсолютно бескорыстную и безвозмездную. Он всегда был готов выехать или вылететь на консультацию, к нему постоянно приезжали больные из самых разных мест, и никто не оставался без внимания и помощи. Когда в Азербайджане началось сельскохозяйственное освоение заболоченных земель и стали применять профилактическое назначение противомаларийных препаратов, у некоторых жителей появились неизвестные ранее формы гемолитической анемии. Лев Иосифович был привлечен к изучению этой проблемы. Результатом работы его и его коллег стало открытие новых форм гемолитических анемий, обусловленных неизвестными ранее видами аномальных гемоглобинов, которые получили названия «Москва» и «Волга». Под этими названиями они были официально зарегистрированы в международном регистре – Л.И. Идельсон был первым, кто сделал такое открытие в СССР.

На протяжении всего периода работы в клинике, руководимой И.А. Кассирским, а позже – А.И. Воробьевым, Лев Иосифович Идельсон читал лекции для приезжавших на учебные циклы врачей, выезжал с докладами и лекциями в разные города страны на многочисленные симпозиумы и учебные семинары. Всегда занятый и вечно куда-то спешащий Лев Иосифович никогда не отказывал во внимании и помощи коллегам, всегда был доброжелательным, добрым и чутким товарищем, радовался успехам не только своих детей, но и детей своих коллег и учеников.

С 1990 г. Лев Иосифович вместе со своей семьей жил и работал в Израиле. Как вспоминает его сын, Григорий Львович, «отец понимал, что переезд в Израиль в 60-летнем возрасте будет снижением статуса, но остаться без детей он никогда не мог. В Израиле он освоился – работал в больнице, совершенствовал ранее выученный английский, выучил иврит, читал на русском языке лекции врачам, готовящимся к сдаче экзамена. Его хорошо помнят и любят. Сейчас ко мне приходят очень много людей, знакомые и незнакомые, говорят: «Ты знаешь, он и меня вылечил... помог... спас... – иногда в той жизни, иногда в Израиле». В Израиле работают его дети, там родились и растут его шестеро внуков.

Мы, соратники Л.И. Идельсона по работе на Кафедре гематологии и трансфузиологии и в ЦКБ № 2 МПС, глубоко скорбим и выражаем искреннее соболезнование семье Льва Иосифовича. Мы всегда будем помнить нашего товарища, учителя и друга, одного из самых замечательных российских гематологов, выдающегося ученого, внесшего весомый вклад в отечественную гематологию.

Друзья и коллеги, коллектив кафедры гематологии и трансфузиологии Российской медицинской академии последиplomного образования.

Редакция журнала «Гематология и трансфузиология» выражает глубокое соболезнование в связи с кончиной выдающегося отечественного ученого и врача, профессора Льва Иосифовича Идельсона, оставившего своими оригинальными работами неизгладимый след в советской (российской) гематологии.

Память о нем навсегда останется в наших сердцах.