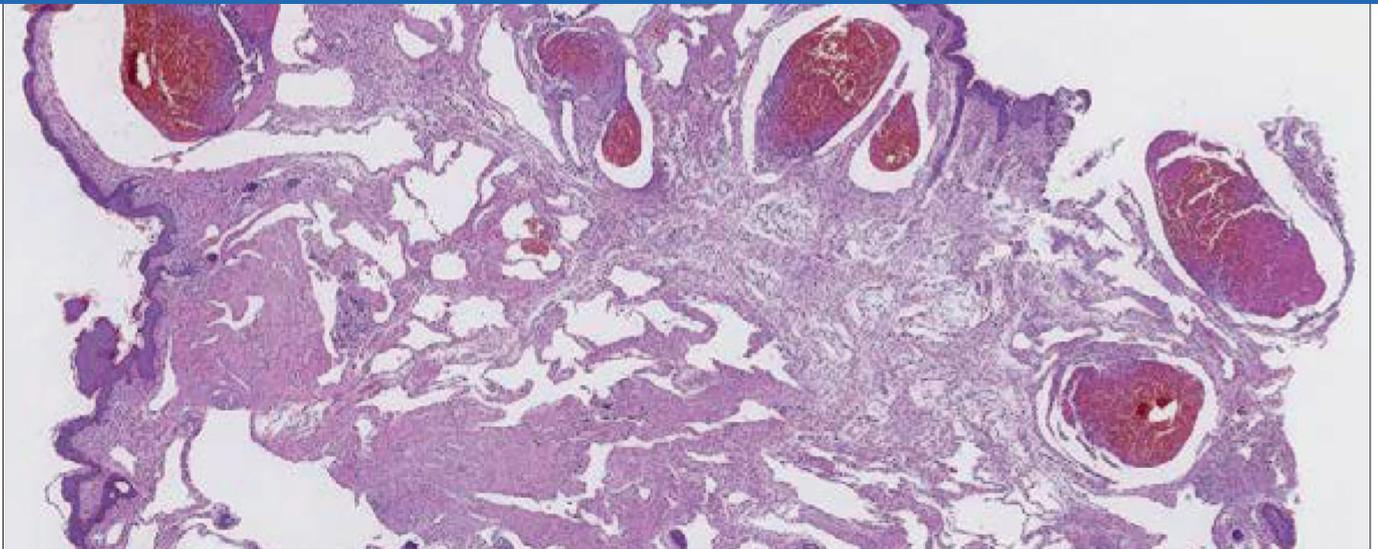


Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии

№ 3 | 18 | 2019

научно-практический журнал



Патологические сосуды в коже при синдроме Бина (H&E, × 8), стр. 83

9

Применение профилактических инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов у пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с TCR α/β - и CD19-деплецией по поводу заболеваний незлокачественной природы

Low-dose infusions of CD45RA depleted donor lymphocytes after TCR α/β -depleted transplantation in patients with non-malignant disorder

35

Имунофенотипическая характеристика острого мегакариобластного лейкоза у детей

Immunophenotypic characterization of acute megakaryoblastic leukaemia in children

41

Синдром Фишера–Эванса у детей: анализ генных нарушений и ответа на терапию

Evans syndrome in children: analysis of the genetic abnormality and response to therapy



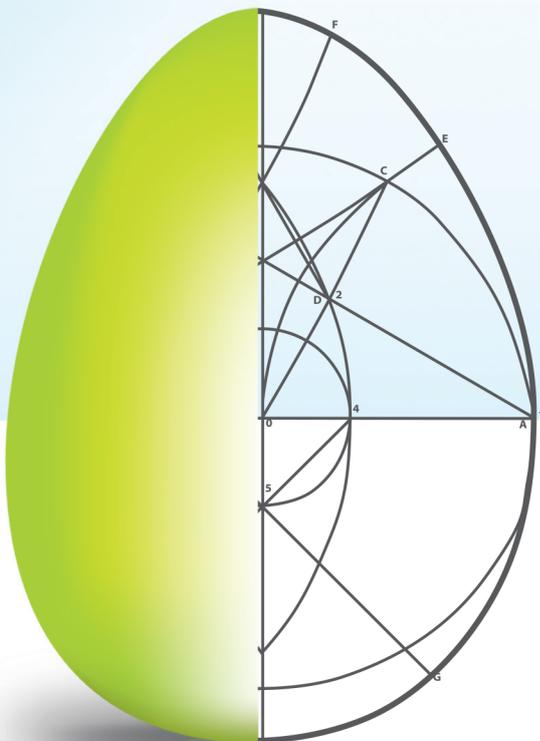
ВРАЧИ
ИННОВАЦИИ
НАУКА —
ДЕТЯМ





привиджен

- Первый и единственный ВВИГ*, стабилизированный пролином^{1,2}
- Готовый к применению 10% раствор ВВИГ¹
- Хорошо переносится даже при высокой скорости инфузии^{1,2}
- Сохраняет стабильность при комнатной температуре в течение 3 лет¹
- Показан к применению у взрослых и детей с 0 лет¹



Совершенство в простоте

ВВИГ – иммуноглобулин для внутривенного введения

КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ПРЕПАРАТА ПРИВИДЖЕН

Группировочное наименование: иммуноглобулин человека нормальный. **Лекарственная форма:** раствор для инфузий. **Состав. Действующее вещество:** белки плазмы человека, из которых иммуноглобулин G не менее 98%, 100 мг/мл. **Вспомогательные вещества:** L-пролин, вода для инъекций. Привиджен не содержит консервантов. Привиджен не содержит в качестве стабилизатора углеводы (например, сахарозы, мальтозы). **Показания. Заместительная терапия у взрослых, детей и подростков (0-18 лет) при:** 1) первичных иммунодефицитах, таких как, но не ограничиваясь: врожденные агаммаглобулинемия и гипогаммаглобулинемия, общая переменная иммунная недостаточность, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдром Вискотта-Олдрича; 2) вторичных иммунодефицитах, таких как, но не ограничиваясь: множественная миелома со вторичной гипогаммаглобулинемией и рецидивирующими бактериальными инфекциями, хронический лимфоидный лейкоз с тяжелой формой вторичной гипогаммаглобулинемии и рецидивирующими бактериальными инфекциями, гипогаммаглобулинемия у пациентов с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, врожденный синдром приобретенного иммунодефицита человека при наличии рецидивирующих инфекций, симптоматическая

гипогаммаглобулинемия, вторичная по отношению к основному заболеванию или лечению. **Иммуномодулирующая терапия у взрослых, детей и подростков (0-18 лет) при:** 1) идиопатической тромбоцитопенической пурпуре у пациентов при высоком риске кровотечений или перед хирургическими вмешательствами с целью коррекции количества тромбоцитов; 2) синдроме Гийена-Барре; 3) болезни Кавасаки; 4) хронических воспалительных демиелинизирующих полинейропатиях. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к действующему веществу или любому другому компоненту, входящему в состав препарата. Повышенная чувствительность к гомологичным иммуноглобулинам, особенно в очень редких случаях дефицита иммуноглобулина A (IgA), когда у пациента присутствуют антитела к IgA. **Форма выпуска.** 25 мл (2,5 г), 50 мл (5 г), 100 мл (10 г). **Условия хранения.** При температуре не выше 25°C в защищенном от света месте. Не замораживать. Хранить в недоступном для детей месте. **Срок годности.** 3 года. Не применять после истечения срока годности, указанного на упаковке. **ПОЖАЛУЙСТА, ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРИВИДЖЕН¹ ПЕРЕД ЕГО НАЗНАЧЕНИЕМ.**

* По данным анализа инструкций по медицинскому применению препаратов ВВИГ официального сайта МЗ РФ - www.gifs.rosminzdrav.ru на 19.08.2019.

Список литературы: 1. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Привиджен. Регистрационный номер ЛП-002452. 2. Stein MR, Nelson RP, Church J et al. Safety and Efficacy of Privigen, a Novel 10% Liquid Immunoglobulin Preparation for Intravenous Use, in Patients with Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2009; 29: 137-144.

Филиал ООО «Си Эс Эл Беринг Биотерапис ГмБХ»
125167, г. Москва, Ленинградский проспект, д. 39, стр. 80
Эл. почта: inforussia@cs Behring.com
Тел.: +7 (495) 788-52-89

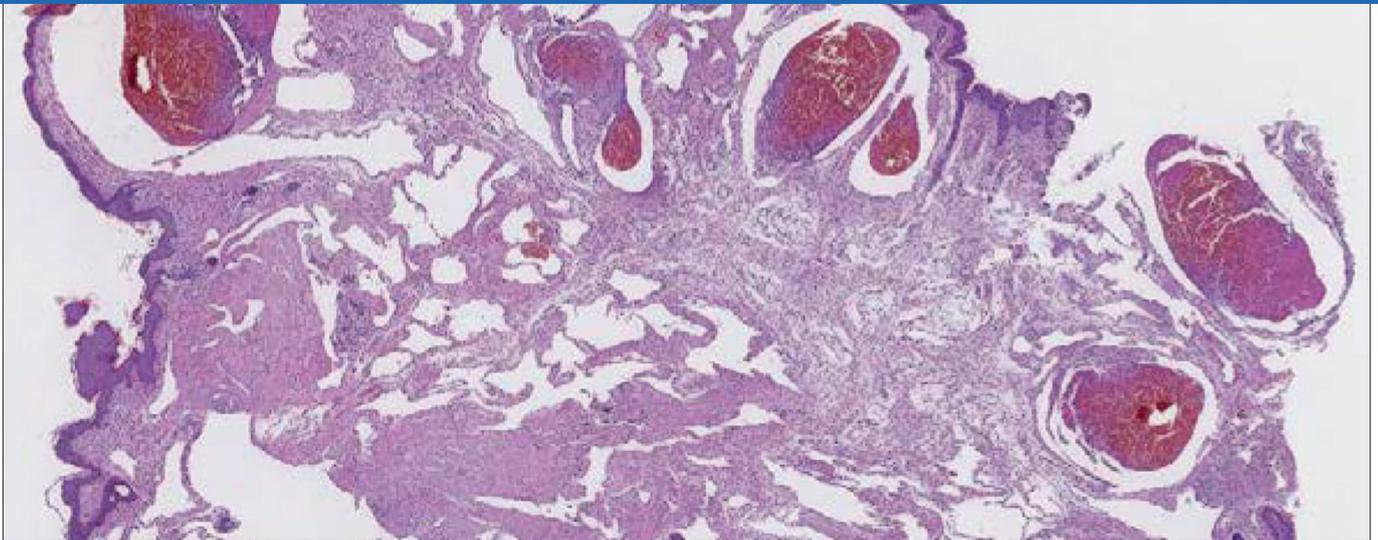


привиджен
Иммуноглобулин для внутривенного
введения, 10% раствор
Простая терапия ВВИГ

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology

№ 3 | 18 | 2019

scientific and practical journal



Bean syndrome dermal vessels pathology (H&E, × 8), page 83

9

Low-dose infusions of CD45RA depleted donor lymphocytes after TCR α/β -depleted transplantation in patients with non-malignant disorder

35

Immunophenotypic characterization of acute megakaryoblastic leukaemia in children

41

Evans syndrome in children: analysis of the genetic abnormality and response to therapy



БРАЧИ
ИННОВАЦИИ
НАУКА —
ДЕТЯМ



A peer-reviewed open-access journal, is published 4 times a year at www.HemOncIm.ru by the Foundation «Doctors, Innovations, Science – for Children’s Benefit» and Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Printed in the Russian Federation. The electronic version of the journal is available online at www.HemOncIm.ru

Information for Subscribers

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology is published 4 times a year. You may subscribe to *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* using a subscription catalogue "Newspapers, Magazines" of Rospechat Agency, subscription index – 12914.

Manuscript Submissions

Please submit your manuscript at http://www.hemoncim.ru/authors_en.html#. More information on manuscript submission is available at http://www.hemoncim.ru/authors_en.html# in corresponding sections.

Advertising

To place an advertisement or receive additional information, please contact us via e-mail: info@vind-fnkc.ru

Commercial Reprints

For commercial reprints, please contact us via e-mail: info@vind-fnkc.ru

Disclaimer

The Publisher and the Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal. The ideas and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and the Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised.

Indexing:

The journal is indexed by *Scopus*, *Ulrich’s Periodicals Directory* and *Russian Science Citation Index*.

Copyright:

Copyright © 2018 by Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology (NMRC PHOI), Oncology and Immunology. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored, translated, or transmitted in any form or by any means without the prior permission in writing from the copyright holder.

Address for correspondence:

Editorial office of Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology:
Samory Mashela St. 1, 117198, Moscow, Russia

For further information on rights and permissions, please contact us via e-mail: info@vind-fnkc.ru

Рецензируемый журнал с открытым доступом, издается 4 раза в год фондом «Врачи, инновации, наука – детям» и Национальным медицинским исследовательским центром детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева. Журнал печатается в Российской Федерации. Электронная версия журнала доступна на сайте: www.HemOncIm.ru

Информация для подписчиков

Журнал «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии» выходит 4 раза в год. Вы можете подписаться на журнал «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии» по каталогу «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать», подписной индекс – 12914.

Подача рукописей

Прислать рукопись можно по ссылке: http://www.hemoncim.ru/authors_en.html# Ознакомьтесь с правилами подачи рукописей можно в соответствующих разделах на сайте: http://www.hemoncim.ru/authors_en.html#

Размещение рекламных материалов

По вопросам размещения рекламы обращайтесь в редакцию. E-mail: info@vind-fnkc.ru

Репринт

По вопросам репринта обращайтесь в редакцию. E-mail: info@vind-fnkc.ru

Дисклеймер

Издатель и редакция не несут ответственности за ошибки или последствия использования информации, публикуемой в данном журнале. Идеи и мнения автора могут не совпадать с точкой зрения издателя и редакции. Издатель и редакция не несут ответственности за содержание и качество размещенных в журнале рекламных материалов.

Индексирование:

Журнал индексируется в *Scopus*, *Ulrich’s Periodicals Directory* и *Российском индексе научного цитирования*.

Авторское право:

© 2018 Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ). Все авторские права сохранены. Запрещается полная или частичная репродукция, хранение, перевод или передача опубликованных материалов в любом виде или любыми средствами без письменного разрешения владельца авторских прав.

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии»:
Россия 117198, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1

Для получения более подробной информации, касающейся авторских прав и разрешений, просим связаться с нами по электронной почте: info@vind-fnkc.ru

Founders

FSBI «Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology» Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow.
Foundation for support and development of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology «Doctors, innovations, science – for children’s benefit».

Publisher

Foundation for support and development of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology «Doctors, innovations, science – for children’s benefit».

The address of the editorial office

Tel.: +7 (495) 287-6579, extension number 1396
www.hemoncim.com
E-mail: journal@fnkc.ru
Advertising department: info@vind-fnkc.ru
Tel.: +7 (495) 287-6570, extension number 5523

The journal is registered in the Federal Service for Monitoring Compliance with Cultural Heritage Protection Law.
Registration number is ПИ № ФС77–69056
The journal was founded in 2002.

The circulation is 3000 copies. The price is free.

Учредители

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва.
Фонд поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Врачи, инновации, наука – детям».

Издатель

Фонд поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Врачи, инновации, наука – детям».

Редакция журнала

Tel.: +7 (495) 287-6579, доб. 1396
www.hemoncim.com E-mail: journal@fnkc.ru
По вопросам рекламы: info@vind-fnkc.ru
Tel.: +7 (495) 287-6570, доб. 5523

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.
Регистрационный номер ПИ № ФС77–69056
Журнал основан в 2002 году.

Тираж 3000 экз. Цена свободная.

ВОПРОСЫ ГЕМАТОЛОГИИ/ОНКОЛОГИИ И ИММУНОПАТОЛОГИИ В ПЕДИАТРИИ

Научно-практический журнал

№ 3 | том 18 | 2019



Главный редактор

Новичкова Галина Анатольевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Заместители главного редактора

Масчан Алексей Александрович
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Москва, Россия

Румянцев Александр Григорьевич
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Сметанина Наталия Сергеевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Члены редколлегии

Алейникова Ольга Витальевна
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН,
Минск, Республика Беларусь

Балашов Дмитрий Николаевич
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Белогурова Маргарита Борисовна
доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург, Россия

Варфоломеева Светлана Рафаэлевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Володин Николай Николаевич
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Москва,
Россия

Демихов Валерий Григорьевич
доктор медицинских наук, профессор, Рязань, Россия

Кит Олег Иванович
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
Ростов-на-Дону, Россия

Кулагин Александр Дмитриевич
доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург, Россия

Масчан Михаил Александрович
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Минков Милен
доктор медицинских наук, профессор, Вена, Австрия

Пантелеев Михаил Александрович
доктор физико-математических наук, Москва, Россия

Паровичникова Елена Николаевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Птушкин Вадим Вадимович
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Решетов Игорь Владимирович
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Москва,
Россия

Румянцев Сергей Александрович
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
Москва, Россия

Трахтман Павел Евгеньевич
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Цаур Григорий Анатольевич
доктор медицинских наук, Екатеринбург, Россия

Щербина Анна Юрьевна
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Редакционный совет

Алексеева Е.И.
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
Москва, Россия

Атауллаханов Ф.И.
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
Москва, Россия

Афанасьев Б.В.
доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург, Россия

Вельте К.
профессор, Тюбинген, Германия

Виллих Н.
профессор, Мюнстер, Германия

Грачев Н.С.
кандидат медицинских наук, Москва, Россия

Карачунский А.И.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Крыжановский О.И.
кандидат медицинских наук, Сан-Франциско, США

Липтон Дж.
профессор, Нью-Йорк, США

Мякова Н.В.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Накагавара А.
профессор, Чиба, Япония

Окс Г.
профессор, Сизтл, США

Родригес-Галиндо К.
профессор, Мемфис, США

Самочатова Е.В.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Скокова Ю.В.
доктор медицинских наук, Тюбинген, Германия

Тер-Ованесов М.Д.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Фечина Л.Г.
кандидат медицинских наук, Екатеринбург, Россия

Чернов В.М.
доктор медицинских наук, профессор, Москва, Россия

Хамин И.Г.
кандидат медицинских наук, Москва, Россия

Хармс Д.
профессор, Киль, Германия

Хенце Г.
профессор, Берлин, Германия

Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК,
в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций
на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.



Editor-in-Chief

Galina A. Novichkova
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Deputy Editors-in-Chief

Alexey A. Maschan
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow, Russian Federation

Alexander G. Rumyantsev
MD, DSc, Professor, Academician of the RAS, Moscow, Russian Federation

Executive Secretary

Nataliya S. Smetanina
MD, PhD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Members of the Editorial Board

Olga V. Aleynikova
MD, Corresponding Member of the NAS, Minsk, Republic of Belarus

Dmitry N. Balashov
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Margarita B. Belogurova
MD, DSc, Professor, Saint Petersburg, Russian Federation

Svetlana R. Varfolomeeva
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Nikolay N. Volodin
MD, DSc, Professor, Academician of the RAS, Moscow, Russian Federation

Valeriy G. Demikhov
MD, DSc, Professor, Ryazan, Russian Federation

Oleg I. Kit
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Rostov-on-Don, Russian Federation

Alexander D. Kulagin
MD, DSc, Professor, Saint Petersburg, Russian Federation

Mikhail A. Maschan
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Mylon Minkov
MD, DSc, Professor, Vienna, Austria

Mikhail A. Panteleev
PhD, DSc, Moscow, Russian Federation

Elene N. Parovichnikova
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Vadim V. Ptushkin
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Igor V. Reshetov
MD, DSc, Professor, Academician of the RAS, Moscow, Russian Federation

Sergey A. Rumyantsev
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow, Russian Federation

Pavel E. Trakhtman
MD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Grigory A. Tzaur
MD, PhD, DSc, Ekaterinburg, Russian Federation

Anna Yu. Shcherbina
MD, PhD, DSc, Professor, Moscow, Russian Federation

Advisory Editors

Alekseeva E.I.
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow, Russia

Ataullakhanov F.I.
MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the RAS, Moscow, Russia

Afanasyev B.V.
MD, DSc, Professor, Saint Petersburg, Russia

Welte K.
Professor, Tübingen, Germany

Willich N.
Professor, Münster, Germany

Grachev N.S.
MD, Moscow, Russia

Karachunskiy A.I.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Kryzhanovsky O.I.
MD, San Francisco, USA

Lipton J.
Professor, New York, USA

Myakova N.V.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Nakagawara A.
Professor, Chiba, Japan

Ochs H.
Professor, Seattle, USA

Rodriguez-Galindo C.
Professor, Memphis, USA

Samochatova E.V.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Skokova Yu.V.
MD, DSc, Tübingen, Germany

Ter-Ovanesov M.D.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Fechina L.G.
MD, PhD, Yekaterinburg, Russia

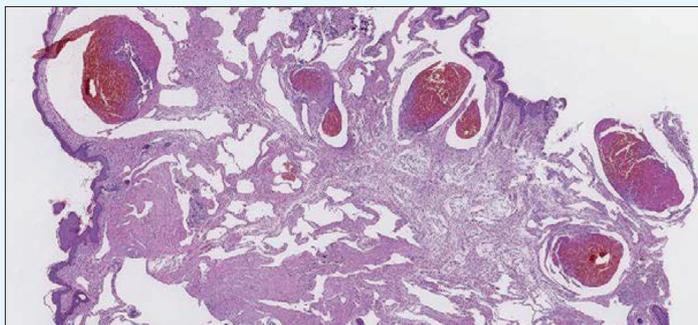
Khamin I.G.
MD, Moscow, Russia

Harms D.
Professor, Kiel, Germany

Henze G.
Professor, Berlin, Germany

Chernov V.M.
MD, DSc, Professor, Moscow, Russia

Оформление обложки:



Патологические сосуды в коже при синдроме Бина (H&E, × 8)

Из статьи Л.А. Хачатрян и соавт. (стр. 83)

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение профилактических инфузий CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов у пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с TCR α/β - и CD19-деплецией по поводу заболеваний незлокачественной природы 9

С.Л. Благов, Л.Н. Шелихова, Д.Н. Балашов, Е.Ю. Осипова, М.В. Ефименко, Н.А. Хрипкова, Я.О. Музалевский, М.А. Дунайкина, Б.С. Першин, А.А. Масчан, М.А. Масчан

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Медико-частотные характеристики анемии Даймонда–Блекфена у детей в Российской Федерации 22

В.М. Чернов, Г.С. Овсянникова, Н.Б. Юдина, А.В. Рогов, Н.Е. Соколова, А.В. Шамин, О.В. Сурьянинова, И.И. Спичак, Т.И. Бурлуцкая, Л.А. Леандрова, А.Н. Чижкова, Т.Л. Костюрина, И.М. Юнусова, Ж.Х. Кумыкова, М.В. Бурнацева, Н.А. Попова, А.П. Шапочник, Е.Г. Бунина, И.В. Пономарева, Р.Х. Галиулин, Л.А. Мазурок, Т.И. Ксензова, И.И. Гуцанская, В.Н. Фокин, В.Г. Стрелец, Е.М. Володичева, Е.Х. Цыденешева, Г.А. Новичкова, Н.С. Сметанина

Особенности гемостаза у детей с врожденными пороками сердца в первые 12 часов жизни 29

О.В. Шумакова, Н.Я. Морозова, А.А. Буров, Ю.Л. Подуровская, Е.Л. Бокерия, И.Е. Нефедова, Д.О. Беришвили, Д.Н. Дегтярев

Имунофенотипическая характеристика острого мегакариобластного лейкоза у детей 35

М.Ю. Алексенко, О.И. Илларионова, Т.Ю. Вержбицкая, Е.А. Зеркаленкова, И.А. Новикова, А.В. Панферова, Л.Г. Фечина, Г.А. Цаур, Ю.В. Ольшанская, А.М. Попов

Синдром Фишера–Эванса у детей: анализ генных нарушений и ответа на терапию 41

Ж.А. Кузьминова, Е.Д. Пашанов, А.В. Павлова, М.А. Курникова, И.В. Мерсиянова, С.А. Плясунова, Н.С. Сметанина

Комбинированное лечение диффузно-склерозирующего остеомиелита нижней челюсти у детей 46

А.Ю. Кугушев, А.В. Лопатин, С.А. Ясонов, Д.С. Синицын

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

- ANKRD26-связанная тромбоцитопения как частный случай наследственной тромбоцитопении с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям** 54
Я.А. Ердумаева, Д.В. Федорова, П.А. Жарков, М.А. Курникова, С.Г. Манн, Е.В. Райкина
- Семейный случай наследственной гемолитической анемии вследствие носительства аномального нестабильного гемоглобина с низкой аффинностью к кислороду (*Hb Cheverly*)** 62
Е.Л. Кривошеина, Н.Ю. Коваль, Е.Н. Егорова, М.А. Горшкова, Н.А. Карамян, Е.А. Литвин, С.Г. Манн
- Витамин В12-дефицитная анемия у детей грудного возраста: клиническая картина, современные методы диагностики и лечения** 70
М.А. Луныкова, В.Г. Демихов, С.Н. Дронова, Ю.Ю. Калинина, О.Н. Журина
- Синдромальная венозная мальформация – диссеминированный венозный ангиоматоз Бина** 78
Л.А. Хачатрян, И.С. Клецкая, Е.В. Орехова
- Инвазивный аспергиллез у детей в дебюте острого миелобластного лейкоза** 88
Ю.В. Диникина, О.В. Шадривова, М.Б. Белогурова, Н.Н. Дохина, С.Н. Хостелиди, С.М. Игнатьева, Т.С. Богомолова, Н.Н. Клишко
- Синдром Клерикозио (пойкилодерма с нейтропенией)** 96
Е.А. Деордиева, О.А. Швец, Е.С. Серова, А.В. Павлова, Е.В. Райкина, С.А. Плясунова, А.И. Манджиева, А.В. Пшонкин, А.Ю. Щербина

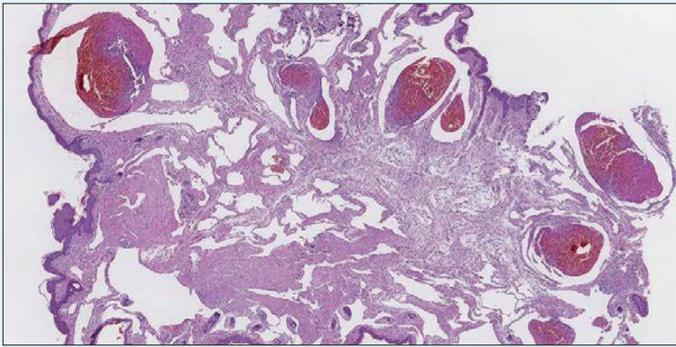
ШКОЛА ИММУНОЛОГА – МНЕНИЕ ЭКСПЕРТА

- Феномен реверсной мутации у пациента с синдромом Вискотта–Олдрича** 104
З.А. Нестеренко, Н.Б. Кузьменко, В.И. Бурлаков, Е.А. Викторова, В.А. Ведмедская, Д.Е. Першин, А.М. Киева, И.В. Мерсиянова, Т.А. Варламова, Е.В. Райкина, Е.В. Дерипапа

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики** 112
Е.А. Пономаренко, А.А. Игнатова, Д.В. Федорова, П.А. Жарков, М.А. Пантелеев
- Обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция: механизмы и потенциальная значимость** 120
А.А. Филькова, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова
- Современное представление о системе комплемента** 130
С.С. Шахиджанов, А.Е. Филиппова, А.А. Бутылин, Ф.И. Атауллаханов
- Актуальность и методы коррекции вторичной гипогаммаглобулинемии в клинической практике** 145
Д.Н. Балашов

Cover design:



Bean syndrome dermal vessels pathology (H&E, × 8)

From the article by L.A. Hachaturyan, et al. (p. 83)

ADVANCED RESEARCH

Low-dose infusions of CD45RA depleted donor lymphocytes after TCR α / β -depleted transplantation in patients with non-malignant disorders 9

S.L. Blagov, L.N. Shelikhova, D.N. Balashov, E.Y. Osipova, M.V. Efimenko, N.A. Khripkova, J.O. Muzalevskiy, M.A. Dunaikina, B.S. Pershin, A.A. Maschan, M.A. Maschan

ORIGINAL ARTICLE

Epidemiological characteristics of Diamond–Blackfen anemia in pediatric population of the Russian Federation 22

V.M. Chernov, G.S. Ovsyannikova, N.B. Yudina, A.V. Rogov, N.E. Sokolova, A.V. Shamin, O.V. Suriyaninova, I.I. Spichak, T.I. Burlutskaya, L.A. Leandrova, A.N. Chizhkova, T.L. Kostyurina, I.M. Yunusova, Zh.Kh. Kurnikova, M.V. Burnatseva, N.A. Popova, A.P. Shapochnik, E.G. Bunina, I.V. Ponomareva, R.Kh. Galiulin, L.A. Mazurok, T.I. Ksenzova, I.I. Gushchanskaya, V.N. Fokin, V.G. Strelets, E.M. Volodicheva, E.Kh. Tsedenisheeva, G.A. Novichkova, N.S. Smetanina

Peculiarities of hemostasis in infants with congenital heart diseases in the first 12 hours of their life 29

O.V. Shumakova, N.Ya. Morozova, A.A. Burov, Yu.L. Podurovskaya, E.L. Bockeriya, I.E. Nefedova, D.O. Berishvily, D.N. Degtyarev

Immunophenotypic characterization of acute megakaryoblastic leukaemia in children 35

M.Yu. Alexenko, O.I. Illarionova, T.Yu. Verzhbitskaya, E.A. Zerkalenkova, I.A. Novikova, A.V. Panferova, L.G. Fechina, G.A. Tsaur, Yu.V. Olshanskaya, A.M. Popov

Fisher–Evans syndrome in children: analysis of the genetic abnormality and response to therapy 41

Z.A. Kuzminova, E.D. Pashanov, A.V. Pavlova, M.A. Kurnikova, I.V. Mersyanova, S.A. Plyasunova, N.S. Smetanina

Combined treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible in children 46

A.Yu. Kugushev, A.V. Lopatin, S.A. Yasonov, D.S. Sinitsyn

CLINICAL OBSERVATION

ANKRD26-related thrombocytopenia: case report and literature review of inherited thrombocytopenias with predisposition to malignancies 54

Ya.A. Erdomaeva, D.V. Fedorova, P.A. Zharkov, M.A. Kurnikova, S.G. Mann, E.V. Raykina

Family case hemolytic anemia due to abnormal unstable hemoglobin with low oxygen affinity (Hb Cheverly) 62

E.L. Krivosheina, N.Yu. Koval, E.N. Egorova, M.A. Gorshkova, N.A. Karamyan, E.A. Litvin, S.G. Mann

Vitamin B12-deficiency anemia in infants: clinical presentation, current diagnostic and treatment	70
M.A. Lunyakova, V.G. Demikhov, S.N. Dronova, Yu.Yu. Kalinina, O.N. Zhurina	
Syndrome associated with multiple venous malformations (Bean syndrome)	78
L.A. Hachatryan, I.S. Kletska, E.V. Orekhova	
Invasive aspergillosis in children in debut of acute myeloid leukemia	88
Y.V. Dinikina, O.V. Shadrivova, M.B. Belogurova, N.N. Dokhina, S.N. Khostelidi, S.M. Ignatyeva, T.S. Bogomolova, N.N. Klimko	
Clericusio syndrome (poikiloderm with neutropenia)	96
E.A. Deordieva, O.A. Shvets, E.S. Serova, A.V. Pavlova, E.V. Raykina, S.A. Plyasunova, A.I. Mandzhieva, A.V. Pshonkin, A.Yu. Shcherbina	

SCHOOL OF IMMUNOLOGY – EXPERT OPINION

The phenomenon of reverse mutation in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome	104
Z.A. Nesterenko, N.B. Kuzmenko, V.I. Burlakov, E.A. Victorova, V.A. Vedmedskaya, D.E. Pershin, A.M. Kieva, I.V. Mersyanova, T.V. Varlamova, E.V. Raykina, E.V. Deripapa	

LITERATURE REVIEW

Platelet functional activity: physiology and laboratory diagnostic methods	112
E.A. Ponomarenko, A.A. Ignatova, D.V. Fedorova, P.A. Zharkov, M.A. Panteleev	
Reversible platelet aggregation in the presence of calcium ions: mechanisms and potential value	120
A.A. Filkova, M.A. Panteleev, A.N. Sveshnikova	
A modern view on the complement system	130
S.S. Shakhidzhanov, A.E. Filippova, A.A. Butilin, F.I. Ataulakhanov	
Relevance and management of secondary hypogammaglobulinemia in clinical practice	145
D.N. Balashov	

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-9-21

© 2019 НМИЦ ДГОИ
Поступила 14.05.2019
Принята к печати 10.06.2019

Применение профилактических инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов у пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплецией по поводу заболеваний незлокачественной природы

С.Л. Благов, Л.Н. Шелихова, Д.Н. Балашов, Е.Ю. Осипова, М.В. Ефименко, Н.А. Хрипкина, Я.О. Музалевский, М.А. Дунайкина, Б.С. Першин, А.А. Масчан, М.А. Масчан

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Вирусные инфекции – ведущая причина негативных исходов терапии у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплецией трансплантата. Мы предположили, что инфузии низких доз CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов (ИДЛ) могут помочь в обеспечении контроля над вирусными инфекциями. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. В работе проанализированы результаты применения низких доз ИДЛ в группе пациентов с незлокачественными гематологическими и иммунологическими заболеваниями. Медиана кратности введения клеточного продукта – 3 инфузии; медиана наблюдения для живых пациентов – 30 мес. Аллергических реакций, септических осложнений после ИДЛ не отмечено. Кумулятивная вероятность de novo острой реакции «трансплантат против хозяина» (oРТПХ) после ИДЛ составила 10%. У 21 (41%) пациента выявлен цитомегаловирус (ЦМВ) в крови; у 16 (73%) пациентов с ЦМВ-виремией вирус выявлен до 1-го введения клеток памяти. Среди пациентов, получивших ИДЛ, у 27 (53%) документировано появление вирус-специфичных лимфоцитов в периферической крови. Таким образом, введение Т-клеток памяти после приживления трансплантата в дозе 25–100 × 10³/кг массы тела реципиента в случае ТГСК от гаплоидентичного донора и 100–300 × 10³/кг для неродственной совместимой ТГСК с TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплецией – безопасный и потенциально эффективный способ обеспечения защиты от вирусных инфекций.

Ключевые слова: инфузия донорских лимфоцитов, аллогенная ТГСК, TCR $\alpha\beta$ -деплеция, CD45RA-деплеция

Благов С.Л. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 9–21; DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-9-21

Контактная информация:Благов Сергей Львович, врач-гематолог отделения ТГСК № 1 НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: sblagov89@gmail.com

Low-dose infusions of CD45RA depleted donor lymphocytes after TCR α/β -depleted transplantation in patients with non-malignant disorders

S.L. Blagov, L.N. Shelikhova, D.N. Balashov, E.Y. Osipova, M.V. Efimenko, N.A. Khripkova, J.O. Muzalevskiy, M.A. Dunaikina, B.S. Pershin, A.A. Maschan, M.A. Maschan

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Viral infections are frequent causes of failure among the recipients of the HSCT with graft TCR α/β and CD19-depletion. Adoptive transfer of memory T-cells by CD45RA-depleted donor lymphocytes infusions (memory DLI) may be useful in control of viral infections. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The work reflects the retrospective data analysis of 51 patients with non-malignant disorders who had received low dose memory DLI after HSCT. Up to 3 doses of donor lymphocytes were administered. Median follow-up for alive patients was 30 (18–49) months. We did not observe any allergic reactions, septic complications after memory DLI. The cumulative incidence of a de novo acute GVHD after DLI was 10% (95% CI: 4–22). Among 41% patients (n = 21) was detected CMV in the blood. In 73% of them (n = 16) CMV was detected before first DLI. Among patients who received DLI, 53% (n = 27) had documented appearance of virus-specific lymphocytes in peripheral blood (ELISPOT assay). Thus, the infusion of memory T-cells at a dose of 25–100 × 10³/kg body weight of the recipient for CD3+ in the case of HSCT from a haploidentical donor and 100–300 × 10³/kg for an unrelated HSCT. Infusions of low dose memory T-lymphocytes after transplant engraftment are safe, potentially effective and constitute a simple measure to prevent infections in the setting of alpha/beta T-cell-depleted transplantation.

Key words: donor lymphocytes infusion, allogeneic HSCT, graft TCR- α/β depletion

Blagov S.L., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2019; 18 (3): 9–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-9-21

© 2019 by NMRC PHOI

Received 14.05.2019
Accepted 10.06.2019**Correspondence:**Sergei L. Blagov, MD, Department of optimization treatment and prevention of complications of hematopoietic stem cell transplantation, Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: sblagov89@gmail.com

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – общепризнанный, а зачастую единственно возможный способ излечения ряда тяжелых врожденных и приобретенных незлокачественных заболеваний крови и иммунной системы у детей [1]. Одно из наиболее опасных осложнений аллогенной ТГСК – реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [2]. Существует эффективный метод предотвращения РТПХ: удаление $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов методом иммуномагнитной $TCR\alpha\beta$ - и $CD19$ -деплеции из трансплантата [2–4]. Данная методика позволяет достичь быстрого приживления и ускорить темпы иммуnoreконституции [5–7]. Учитывая более низкий уровень вероятности возникновения РТПХ, данная технология позволяет снизить объемы и длительность необходимой иммуносупрессивной терапии в посттрансплантационном периоде. К числу негативных эффектов после проведения $TCR\alpha\beta$ -деплеции относится отсроченное восстановление функции адаптивного иммунитета, что обуславливает высокую частоту вирусных инфекций до периода окончательного становления иммунитета реципиента [2, 3, 8, 9].

Согласно ранее опубликованным данным анализа опыта НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (далее – НМИЦ ДГОИ), вероятность реактивации ЦМВ-виремии у пациентов, перенесших аллогенную ТГСК с $TCR\alpha\beta$ -деплецией по поводу заболеваний крови и иммунной системы незлокачественной природы, составляет 39%; медиана реактивации – 1 месяц после ТГСК [10]. Длительная персистенция вирусных патогенов, в частности ЦМВ, у пациентов с индуцированным дефицитом Т-клеточного звена зачастую приводит к тяжелым висцеральным поражениям и может стать ведущей причиной трансплантационной смертности [7, 9, 11, 12]. Контроль таких инфекций требует больших затрат, резко ограничивая возможности трансплантационного ресурса клиники.

Существует технология адаптивного переноса патоген-специфичного иммунитета, базирующаяся на принципах *ex vivo* стимуляции или селекции вирус-специфичных донорских лимфоцитов против конкретных возбудителей с последующей их трансфузией реципиентам, но сложность и высокая стоимость данного метода не способствуют его доступности в рутинной клинической практике [13–16]. Все большее применение находит технология, альтернативная переносу вирус-специфичных лимфоцитов, – инфузия фракции Т-лимфоцитов памяти, полученной в результате иммуномагнитной деплеции наивных Т-лимфоцитов при помощи анти- $CD45RA$ антител. Клеточный продукт, лишенный

наивного компонента ($CD45RA$ -деплецированный), обладает низкой аллореактивностью, при этом несет в себе иммунную память к широкому комплексу патогенов, таких как цитомегаловирус (ЦМВ), аденовирус (АДВ) и вирус Эпштейна–Барр (ЭБВ). Негативные последствия инфицирования вышеописанными агентами наиболее выражены у реципиентов $TCR\alpha\beta$ - и $CD19$ -деплецированных ТГСК, не достигших иммуnoreконституции. Таким образом, применение инфузии данного клеточного продукта в раннем посттрансплантационном периоде пациентам, перенесшим аллогенную ТГСК с деплецией $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов, может послужить крайне полезным инструментом в ускорении иммуnoreконституции и обеспечении дополнительного контроля над вирусными инфекциями в период вторичного посттрансплантационного иммунодефицита [17–22].

Гипотеза о безопасности инфузий донорских лимфоцитов памяти нашла подтверждение в ранее опубликованных нашей группой результатах пилотного исследования и ретроспективного анализа в расширенной группе пациентов со злокачественными новообразованиями гемопоэтической и лимфоидной ткани на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России [23, 24].

В настоящей работе показаны результаты ретроспективного анализа безопасности и потенциальной эффективности данного метода у когорты пациентов, перенесших аллогенную ТГСК по поводу первичных иммунодефицитных состояний (ПИД) и заболеваний крови незлокачественной природы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Проанализированы данные 51 пациента, перенесшего аллогенную ТГСК с процессингом трансплантата посредством технологии $TCR\alpha\beta$ - и $CD19$ -деплеции от полностью ($n = 22$) либо частично ($n = 12$) совместимых неродственных и гаплоидентичных ($n = 17$) доноров. Обязательными условиями включения пациентов, помимо факта проведенной аллогенной деплецированной ТГСК по поводу заболевания крови незлокачественной природы, были документированное приживление трансплантата (гемограмма, общий донорский химеризм в периферической крови $> 95\%$), ЦМВ-серопозитивный статус пары «донор–реципиент», а также отсутствие активных признаков РТПХ, течения сепсиса или иной неконтролируемой инфекции на момент первого введения клеток памяти.

За период с 26.09.2014 по 18.04.2017 инфузию $CD45RA$ -деплецированных донорских лимфоцитов (ИДЛ) получили 78 пациентов, трансплантированных

по поводу нозологий незлокачественной природы. Из настоящего анализа исключены реципиенты повторных ТГСК ($n = 5$), а также 22 больных, получивших первое введение Т-клеток памяти в первые две недели после ТГСК – до констатации приживления трансплантата, либо позднее 3 мес. с момента ТГСК. Средний возраст пациентов на момент первого введения клеток памяти составил 5 лет (от 0 до 22 лет). Все пациенты были трансплантированы по поводу незлокачественных гематологических либо иммунологических заболеваний: тяжелая приобретенная апластическая анемия ($n = 12$), врожденная костномозговая недостаточность ($n = 5$), гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз ($n = 5$), ПИД ($n = 29$). Характеристика пациентов, доноров, нозологические формы заболеваний, а также состав трансплантата представлены в *таблице 1*.

Таблица 1
**Характеристика реципентов, доноров.
Состав трансплантата**

Пациенты	n
Пол, м:ж	38:13
Возраст на момент ТГСК	5 (0–22)
Диагноз	
ПАА	12
ВАА	5
НЛН	5
ПИДС	29
Синдром Вискотта–Олдрича	13
Синдром Ниймеген	5
XLP	3
ХГБ	2
Другие	6
Доноры	
Гаплоидентичные	16
Совместимые неродственные (родственные)	35
Возраст доноров	31 (19–52)
Пол доноров, м:ж	27:24
Состав трансплантата	
CD34+ × 10 ⁶ /кг	10 (3–20)
TCRαβ+ × 10 ³ /кг	22 (1–461)
CD19+ × 10 ³ /кг	143 (2–2330)

Примечание: ПАА – тяжелая приобретенная апластическая анемия; ВАА – врожденная костномозговая недостаточность; НЛН – гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; ПИДС – первичный иммунодефицит; XLP – х-сцепленный лимфопротрофиеративный синдром; ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь.

Режимы кондиционирования и профилактика РТПХ. Пациенты с первичными иммунодефицитными состояниями и гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом в качестве базового алкилирующего агента получали треосульфан в дозе от 36 до 42 г/м² в комбинации с мельфаланом – 140 мг/м² ($n = 20$) либо тиофосфамидом – 10 мг/кг ($n = 7$). Пациенты с синдромом Ниймеген ($n = 4$) в кондиционировании получили бусульфид – 4 мг/кг и циклофосфамид – 40 мг/кг. Один пациент с синдромом Ниймеген и пациент с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью получили 1 алкилятор – треосульфан в дозе 36 г/м². Один пациент с синдромом Вискотта–Олдрича получил кондиционирование в составе треосульфан в дозе 42 г/м² и циклофосфамид – 120 мг/кг. Пациенты с тяжелой приобретенной апластической анемией ($n = 12$) и синдромами врожденной костномозговой недостаточности ($n = 5$) получали циклофосфамид – 100 мг/кг ± тиофосфамид – 10 мг/кг и торакоабдоминальное облучение в дозе от 2 до 6 Гр. В рамках протокола, инициированного в клинике НИИЦ ДГОИ, 11 пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича с целью предотвращения тяжелых дисфункций или отторжения трансплантата дополнительно получили плериксафор в дозе 240 мкг/кг (–6–4-й дни).

Серотерапия была представлена кроличьим антиtimoцитарным иммуноглобулином (Тимоглобулин, *Genzyme*) в дозе 5 мг/кг ($n = 39$) или лошадиным антиtimoцитарным иммуноглобулином (АТГАМ, *Pfizer*) – 100 мг/кг ($n = 12$). Одна пациентка с ПИД получила алемтузумаб (*Campath, Genzyme*) в суммарной дозе 1 мг/кг. Все пациенты получали иммуносупрессивную профилактику РТПХ. Режим профилактики РТПХ варьировал в зависимости от диагноза и типа донора. В качестве базового иммуносупрессивного препарата применяли такролимус. С 1-го по +45-й день профилактическое иммуносупрессивное лечение получили 15 (29%) пациентов. На 60-й день такролимус был отменен у 18 (35%) больных. Часть пациентов получила такролимус в сочетании с микофенолатом мофетилом ($n = 4$) или метотрексатом ($n = 4$) – 5 мг/м² на +1-й, +3-й, +6-й дни. При отсутствии проявлений у больных острой РТПХ (oРТПХ) отмена иммуносупрессивной профилактики осуществлялась в индивидуальном порядке. Подробные данные о режиме кондиционирования у пациентов и профилактике РТПХ представлены в *таблице 2*.

Процессинг трансплантата. Источником трансплантата у пациентов служили донорские периферические стволовые клетки крови, стимулированные перед аферезом гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ). Процессинг с удалением αβ-T- и В-лимфоцитов (CD19+) проводили

Таблица 2

**Режимы кондиционирования.
Профилактика РТПХ**

Режим кондиционирования	n
Флударабин/циклофосфамид/тиотепа/ТАО 4 Гр	2
Флударабин/циклофосфамид/тиотепа/ТАО 6 Гр	2
Флударабин/циклофосфамид/бусульфан	4
Флударабин/циклофосфамид/треосульфан	1
Флударабин/циклофосфамид/ТАО 2 Гр	10
Флударабин/циклофосфамид/ТАО 4 Гр	2
Флударабин/циклофосфамид/ТАО 6 Гр	1
Флударабин/треосульфан/мельфалан	20
Флударабин/треосульфан/тиофосфамид	7
Флударабин/треосульфан	2
Серотерапия	
Тимоглобулин	39
АТГ	12
Посттрансплантационная профилактика РТПХ	
Такролимус до +45 дня	15
Такролимус до +60 дня	18
Такролимус до +90 дня и далее	9
Такролимус до +60, микрофенолат до +30 дня	4
Такролимус до +60 дня Метотрексат, 5 мг/м ² , +1; +3; +6 дни	4
Глюкокортикостероиды	1

Примечание: ТАО – торакоабдоминальное облучение.

Таблица 3

Состав и тайминг инфузий CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов

Показатель		ИДЛ № 1 n = 51	ИДЛ № 2 n = 46	ИДЛ № 3 n = 34
День ИДЛ*		35 (20–70)	69 (41–219)	116 (60–372)
CD3 (CD45RO) доза, 10 ³ /кг	** Гапло n = 16 Совместим. n = 35	25 (n = 15)* 50 (n = 1)	25 (n = 2) 50 (n = 12) 100 (n = 1)	25 (n = 1) 50 (n = 7) 100 (n = 2)
	*** Совместим. n = 35	25 (n = 17) 50 (n = 2) 100 (n = 16)	25 (n = 1) 50 (n = 14) 100 (n = 1) 200 (n = 15)	50 (n = 3) 100 (n = 11) 200 (n = 1) 300 (n = 9)
CD45RA * 10 ³ /кг		0	0	0
ЦМВ-Т/кг (медиана)		19 (0–1279)	36 (0–2559)	57 (0–3838)
Адено-Т/кг (медиана)		9 (0–79)	17 (0–158)	19 (0–316)
ЭБВ-Т/кг (медиана)		7 (0–236)	14 (0–472)	22 (0–707)

*Донорская инфузия лимфоцитов; **реципиенты гаплоидентичных ТГСК;
***реципиенты ТГСК от совместимых неродственных (родственных) доноров.

на аппарате *CliniMACS Plus* (Miltenyi Biotec, Германия). Медиана эффективности деплеции для $\alpha\beta$ -Т- и В-лимфоцитов составляла 4,2 (от 3,3 до 6,1) *log* и 3,1 (от 1,4 до 4,2) *log* соответственно. Медиана дозы $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов в трансплантате – $16,3 \times 10^3$ /кг (от 1 до 461×10^3 /кг); В-клеток – 170×10^3 /кг (от 2 до 2230×10^3 /кг) и CD34+ клеток – 10×10^6 /кг (от 6 до 13×10^6 /кг).

Заготовка фракции донорских лимфоцитов памяти. У 50 (98%) пациентов в качестве субстрата для получения донорских клеток памяти использовали продукт афереза Г-КСФ-стимулированных доноров. Продукт лейкоцитафереза от нестимулированного донора получила 1 (2%) пациентка. Для всех пациентов (n = 51) провели процессинг с удалением CD45RA+ клеточной фракции из исходного материала, содержавшего от 2 до 5×10^9 мононуклеаров (MNC), с применением технологии иммуномагнитной сортировки на платформе *CliniMACS Plus, Depletion 2,0* (n = 10) или *CliniMACS Prodigy* (n = 41). Дозу иммуномагнитного реагента выверяли пропорционально объему инкубации. Полученный продукт вводили как «свежим», так и после разморозки. Медиана эффективности деплеции для CD3+CD45RA+ фракции составила 3,8 *log* (от 1,8 до 5,2 *log*), а «выход» CD3+CD45RO+ – 38% (от 14 до 64%). Замороженные аликвоты впоследствии были ретроспективно оценены на предмет содержания ЭБВ, ЦМВ и АДВ-специфичных лимфоцитов посредством методики IFN- γ ELISPOT (таблица 3).

Режимы введения инфузий донорских лимфоцитов. После верификации приживления трансплантата, на +30-е сут после аллогенной Т-деплетированной ТГСК, в случае отсутствия признаков острой РТПХ, а также течения активного септического процесса пациенты планомерно получали заранее заготовленный CD45RA-деплетированный клеточный продукт от инициальных доноров. Первый раз Т-клетки памяти вводили в количестве (расчет на CD3+) 25×10^3 /кг (для реципиентов гаплоидентичных трансплантаций) или 100×10^3 /кг (для реципиентов полностью совместимых неродственных ТГСК). Далее пациентам продолжали вводить CD45RA-деплетированные донорские лимфоциты с интервалом 1 месяц и последующей эскалацией дозы – максимум до 100×10^3 /кг при гаплоидентичных ТГСК и 300×10^3 /кг при ТГСК от неродственных доноров. Коррекция дозы допускалась индивидуально, по согласованию с руководителем протокола, в зависимости от клинической ситуации. План введения Т-клеток памяти меняли (снижение дозы) в случае предшествующих накануне клинических проявлений оРТПХ. При нарастании вирусной нагрузки (ЦМВ, АДВ-инфекция), плохо контролируемой стандартными лекарственными препаратами,

дозу вводимых лимфоцитов увеличивали. Состав и тайминг инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов представлены в *таблице 3*.

Лабораторный мониторинг. ЦМВ, ЭБВ или АДВ-виремию диагностировали при наличии более 500 копий вирусной ДНК на 1 мл цельной венозной крови. Реактивацией считали положительный результат ПЦР после двух последовательных отрицательных еженедельных значений. ЦМВ-, АДВ- или ЭБВ-болезнь констатировали в случае обнаружения вирусной ДНК либо иммуногистохимической детекции вирусного антигена в соответствующем образце ткани с клиническими признаками повреждения органа (независимо от наличия вирусной ДНК в крови). Фоскарнет и ганцикловир не применяли в качестве плановой лекарственной противовирусной профилактики. Мониторинг ЦМВ, ЭБВ и АДВ проводили еженедельно с помощью количественной ПЦР венозной крови – со дня ТГСК до +30-х сут после последней ИДЛ, а затем – в зависимости от проводимой иммуносупрессивной терапии, предшествующих данных вирусной активации и данных восстановления иммунитета.

После первого обнаружения ДНК ЦМВ (> 500 коп./мл крови) назначали лекарственную терапию препаратами ганцикловир или фоскарнет. Обнаружение ЦМВ-специфичных Т-клеток проводили по методике IFN- γ ELISPOT перед первым и каждым последующим ИДЛ, через месяц после последнего ИДЛ и через год после ТГСК. Титр ЭБВ- и АДВ-специфических донорских лимфоцитов контролировали у пациентов также с помощью анализа IFN- γ ELISPOT. Степень РТПХ оценивали в соответствии со стандартными критериями [24].

Методика IFN- γ ELISPOT. Мононуклеарные клетки выделяли из свежей цельной крови с использованием специализированной среды (*Cedarlane Laboratories Limited*). Далее происходила их разморозка с последующим помещением на водяную баню при температуре 37 °С. После промывки в стерильном натрий-фосфатном буферном растворе клетки подсчитывали на цитометре и ресуспендировали в бессывороточных тестируемых средах CTL-TestTM (*Cellular Technology Limited, CTL*). Для исследования использовали антигены: *PepTivator CMV pp65-premium grade*, *PepTivator AdV5*, *Hexon-premium* и *PepTivator*, *EBV Consensus-premium grade* (*Miltenyi Biotec*, Бергиш-Гладбах, Германия) в концентрации 0,6 нмоль/мл. Вирус-специфичные Т-клетки были обнаружены с помощью анализа ELISPOT с использованием набора IFN- γ ELISPOT (CTL). Фитогемагглютинин использовали в качестве неспецифического стимулятора для положительного контроля в конечной концентрации 100 мкг/мл. Все манипуляции с клетками и разведения антигена

проводили в бессывороточной среде. Антиген-индуцированную продукцию IFN- γ измеряли в трех повторных лунках на автоматизированном считывателе *Elispot ImmunoSpot Series 5 UV Analyzer* (С.Т.Л, Кливленд, Огайо) с использованием автоматизированного программного обеспечения.

Дизайн исследования и статистический анализ.

Ведущей исследуемой проблемой данного ретроспективного анализа в рамках оценки безопасности метода было определение кумулятивной вероятности возникновения оРТПХ после ИДЛ. Смерть от любой причины без признаков РТПХ, а также отторжение трансплантата считали конкурирующими событиями. Были также исследованы динамика иммунного ответа к ЦМВ, темпы иммунореконституции и основные клинические исходы, включая общую выживаемость, смертность, связанную с трансплантацией, кумулятивную вероятность возникновения хронической РТПХ (хРТПХ). Для сравнения групп использовали тест Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Общую выживаемость рассчитывали по методу Каплана–Майера. В качестве конкурирующего события по отношению к смертности, связанной с трансплантацией, было определено отторжение трансплантата.

Для анализа общей и бессобытийной выживаемости живые пациенты были цензурированы 01.09.2018. Все участники исследования (либо их законные опекуны) предоставили информированное согласие на участие в проекте. Пилотный протокол был зарегистрирован под номером NCT02337595 на сайте www.ClinicalTrials.gov.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За период с сентября 2014 по апрель 2017 года 51 пациент получил 135 инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов. Медиана кратности введений клеточного продукта – 3 (от 1 до 3) инфузии для каждого больного. В ИДЛ содержались различные уровни вирус-специфичных Т-клеток (*таблица 3*). Медиана наблюдения для живых пациентов на момент написания данной работы составила 30 (18–49) мес.

Статус пациентов на момент первой инфузии клеток памяти. У 4 пациентов первые признаки оРТПХ II–III стадии выявили до ИДЛ № 1. На момент первой инфузии Т-клеток памяти активных признаков оРТПХ не было ни у одного больного. Все пациенты получали плановую иммуносупрессивную профилактику.

Безопасность (реакция «трансплантат против хозяина»). Ни одна из инфузий клеток памяти не была осложнена аллергическими реакциями или сопряжена с присоединением септического

Таблица 4

Характеристика пациентов, развивших острую либо хроническую реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) после ИДЛ

МИС ID	Диагноз	Возраст, лет	Тип ТГСК	oРТПХ II–III ст., день после ТГСК	Стадия oРТПХ	oРТПХ II–III ст. до ИДЛ № 1	oРТПХ II–III ст. после ИДЛ	oРТПХ II–III ст., дни от крайнего ИДЛ	После какой ИДЛ oРТПХ?	Локус oРТПХ	Хронич. РТПХ	Локус xРТПХ	Исход на момент написания работы
29102	ТКИН	1	Гапло	81	II	Нет	Да	27	2	Кожа, ЖКТ	Нет	–	Отторжение трансплантата, умер после повторной ТГСК
32663	ХГБ	1	Неродств. 9/10	148	II	Нет	Да	7	4	ЖКТ	Да	ЖКТ	Реконвалесцент, ИСТ отменена
15709	ПАА	5	Гапло	10	III	Да	Да	2	3	Кожа, ЖКТ	Да	Кожа, ЖКТ	Реконвалесцент, ИСТ отменена
21436	ПАА	13	Неродств.	24	II	Да	Да	19	2	ЖКТ	Нет	–	Реконвалесцент, ИСТ отменена
38963	WAS	1	Гапло	189	II	Нет	Да	90	2	Кожа	Да	Кожа	Реконвалесцент, ИСТ отменена
21097	HLH	1	Неродств.	39	II	Нет	Да	18	1	ЖКТ	Нет	–	Реконвалесцент, ИСТ отменена
38192	WAS	2	Гапло	104	II	Нет	Да	1	2	Кожа	Да	Кожа	Проявлений РТПХ нет, снижение ИСТ
2329	ПАА	13	Неродств. 9/10	–	–	Нет	Нет	–	–	–	Да	Кожа	Реконвалесцент

Рисунок 1

Кумулятивная вероятность возникновения острой РТПХ II–III стадии у всех пациентов исследуемой группы

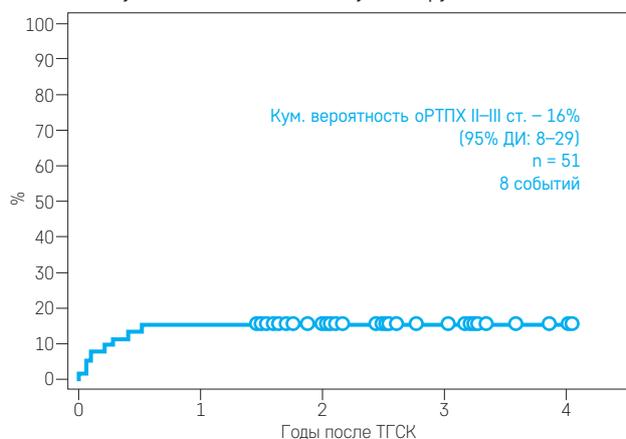


Рисунок 2

Кумулятивная вероятность возникновения острой РТПХ II–III стадии после введения клеточного продукта пациентам, ранее не имевшим признаков острой РТПХ

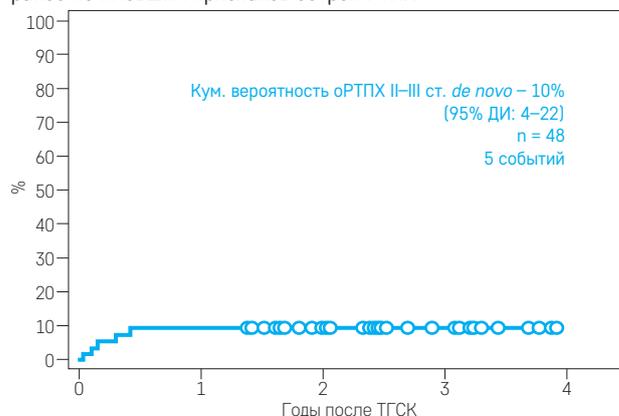


Рисунок 3

Кумулятивная вероятность возникновения хронической РТПХ у всех пациентов исследуемой группы

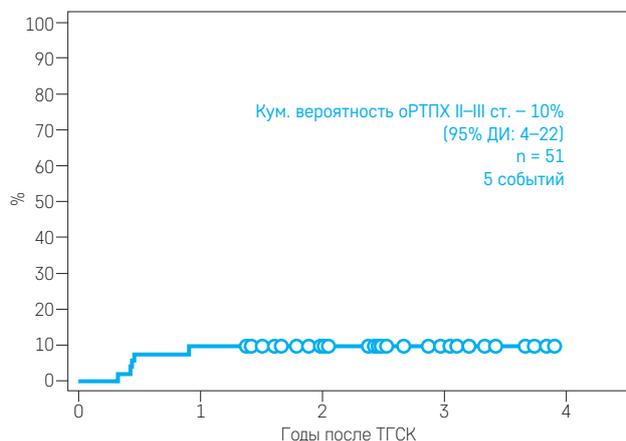
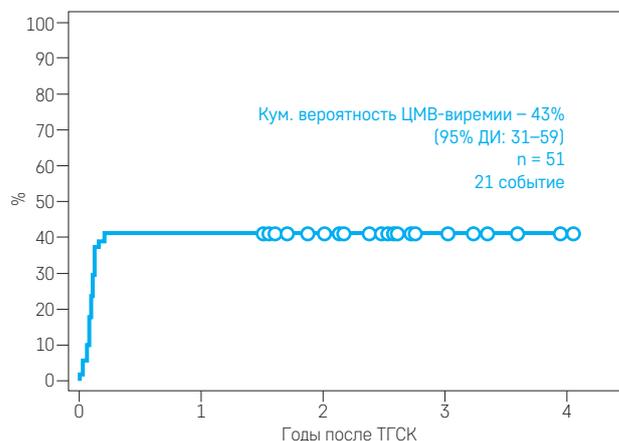


Рисунок 4

Кумулятивная вероятность ЦМВ-виремии у всех пациентов исследуемой группы



процесса. Признаки оРТПХ II–III стадии после ИДЛ развили 7 пациентов. Активация оРТПХ у одного больного произошла через 18 дней после ИДЛ № 1; у 4 больных – после ИДЛ № 2 (через 1; 19; 27 и 90 дней) и у одного пациента – через 2 дня после ИДЛ № 3. У одного пациента манифестация оРТПХ произошла через 7 дней после 4-й инфузии клеток памяти, выполненной на +141-е сут после ТГСК с целью усиления терапии вирусных инфекций. Признаки оРТПХ на одном из этапов наблюдения (до либо после инфузии клеток памяти) возникли у 8 пациентов. Таким образом, кумулятивная вероятность возникновения оРТПХ для всей группы пациентов ($n = 51$) составила 16% (95% ДИ: 8–29) (рисунки 1). У одного пациента возникла оРТПХ III стадии. Проявлений оРТПХ IV стадии не было ни у одного из больных. У 5 пациентов оРТПХ II–III стадии возникла *de-novo* после инфузии клеточного продукта. Таким образом, кумулятивная вероятность *de-novo* оРТПХ после ИДЛ составила 10% (95% ДИ: 4–22) (рисунки 2).

Среди 7 пациентов, развивших оРТПХ после ИДЛ, двое ответили на стандартную иммуносупрессивную терапию. Хроническая РТПХ развилась у 4 пациентов этой группы, все они живы на момент анализа; двое продолжают терапию РТПХ. У одного пациента развилась *de novo* хРТПХ с поражением кожи. Кумулятивная вероятность возникновения хРТПХ составила 10% (95% ДИ: 4–22) (рисунки 3). У одного пациента с активацией оРТПХ *de-novo* произошло отторжение трансплантата; он умер после повторной аллогенной ТГСК. Подробные характеристики всех случаев активации острой и хронической РТПХ после ИДЛ представлены в таблице 4.

Вирусные инфекции. У 21 пациента документирована ЦМВ-виремия, таким образом, кумулятивная вероятность активации ЦМВ в крови для всей группы больных составила 41% (95% ДИ: 31–59) (рисунки 4). У 16 (73%) пациентов ЦМВ-виремия была зарегистрирована до или в течение 1 недели после первой ИДЛ; медиана срока реактивации – 11 (от 1 до 43) дней до 1-й инфузии. У 6 (12%) пациентов ЦМВ-реактивация произошла после начала профилактических ИДЛ. Все пациенты с обнаруженным ЦМВ в крови ($n = 22$) получили упреждающую фармакологическую противовирусную терапию (ганцикловир или фоскарнет). Медиана продолжительности ЦМВ-позитивности составила 4 (1–12) недели; медиана количества реактиваций – 1 (1–2) неделю; медиана длительности лекарственной противовирусной терапии – 6 (2–15) недель. ЦМВ-болезнь развилась у 6 пациентов (28% общего числа пациентов с ЦМВ-виремией и 12% всех пациентов) с присоединением ЦМВ-хориоретинита ($n = 4$), ЦМВ-пневмонии ($n = 2$). Медиана

манифестации ЦМВ-болезни – 5-я неделя (0–14-я неделя) от первого обнаружения ЦМВ в крови. Пациентам с ЦМВ-хориоретинитом еженедельно проводили интравитреальные инъекции противовирусных препаратов с детекцией ДНК ЦМВ в глазной жидкости (ПЦР). У одного пациента, перенесшего ЦМВ-хориоретинит, впоследствии диагностировали отслойку сетчатки обоих глаз. Одна пациентка умерла от резистентной ЦМВ-пневмонии. Подробные характеристики пациентов с течением ЦМВ-инфекции – в таблице 5. ЭБВ-инфекция, требовавшая лекарственной коррекции, не была зарегистрирована ни у одного пациента на этапе посттрансплантационного периода. У 4 пациентов выявили аденовирусную инфекцию; у 3 – в крови и кале, в связи с чем им была проведена терапия сидофовиром – с эффектом. У одного пациента, продолжительно получавшего иммуносупрессивную терапию по поводу аутоиммунного гемолиза, отмечено резистентное течение ЦМВ и АДВ-болезни с поражением легких и кишечника, что послужило непосредственной причиной его смерти.

Мониторинг противовирусного иммунного ответа. У 9 пациентов ЦМВ-реактивные Т-клетки были обнаружены до ИДЛ № 1; 9 пациентов не имеют достоверных результатов анализа ELISPOT во всех необходимых временных периодах, поэтому только 33 пациента могут быть оценены на предмет влияния инфузий Т-клеток памяти как фактора, потенциально способствующего восстановлению ЦМВ-специфического иммунного ответа. У 10 из 33 пациентов из группы ЦМВ-негативных на момент t_0 (непосредственно перед ИДЛ № 1) были обнаружены ЦМВ-реактивные клетки в момент t_1 (непосредственно перед ИДЛ № 2). Еще у 5 пациентов ЦМВ-реактивные Т-клетки были выявлены в момент времени t_2 (перед ИДЛ № 3) и у одного пациента – в момент t_3 (через 30 дней после ИДЛ № 3) (рисунки 5). В целом восстановление ЦМВ-специфического иммунитета после ИДЛ зарегистрировано у 16 (48%) пациентов. Среди этих случаев медиана максимального количества ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов между t_0 и $t_{\max 1-3}$ составила 652 (от 5 до 1340) клеток на 300 тыс. МНС крови (рисунки 6).

Анализ показал, что у 12 (81%) из 16 пациентов с детектируемым иммунным ответом к ЦМВ была ЦМВ-виремия, в то время как среди пациентов без ЦМВ-реактивности – у 3 (18%). Таким образом, обнаружение ДНК ЦМВ в крови достоверно связано с восстановлением ЦМВ-специфического иммунитета (критерий Фишера, $p < 0,0001$). Значимой корреляции между количеством ЦМВ-специфических лимфоцитов в ИДЛ и ЦМВ-Т-реактивностью у исследуемой группы больных получено не было: у пациентов с ЦМВ-Т-реактивностью медиана дозы

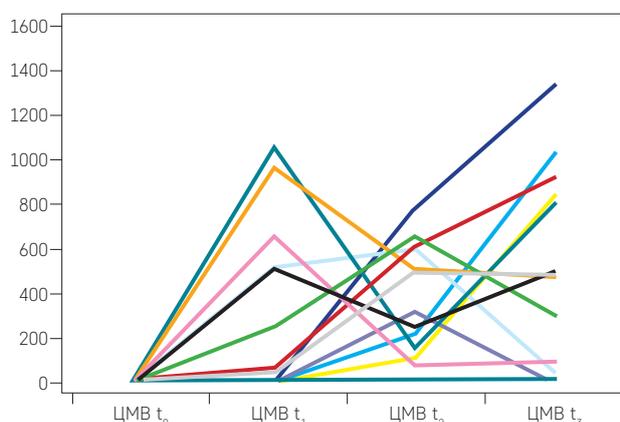
Таблица 5

Характеристика пациентов с ЦМВ-инфекцией (n = 21)

МИС ID	Диагноз	Тип ТГСК	Любая ОРТПХ	ИСТ после ИДЛ	Актив. ЦМВ до ИДЛ	Кол-во реакт. ЦМВ	Длит-ть ЦМВ, нед.	Период лекарст. терапии ЦМВ	ЦМВ-болезнь	Орган поражения ЦМВ	ЦМВ до ТГСК	Исход ЦМВ-инфекции на момент написания работы
42365	ПАА	Неродств.	Да	1	Да	2	6	10	Да	Ретинит	Нет	Реконвалесцент
29102	ТКИН	Гапло	Да	1	Да	1	1	2	Нет		Нет	Отторжение трансплантата, смерть после повторной ТГСК
17942	ПИД	Неродств.	Нет	1	Нет	1	6	10	Нет		Виремия	Реконвалесцент
19724	ПАА	Неродств.	Нет	1	Да	1	5	7	Нет		Нет	Реконвалесцент
29000	ПИД	Гапло	Нет	1	Нет	1	7	7	Да	Ретинит	Виремия, пневмония	Отторжение трансплантата
16755	ПАА	Неродств.	Нет	0	Да	1	5	4	Да	БАЛ	Нет	Смерть от инфекции
21436	ПАА	Неродств.	Да	1	Нет	1	2	4	Нет		Нет	Реконвалесцент
9346	ПАА	Гапло	Да	1	Нет	1	1	3	Нет		Нет	Реконвалесцент
576	ПИД	Неродств.	Нет	1	Нет	2	4	6	Нет		Нет	Реконвалесцент
25597	ПИД	Неродств.	Нет	0	Нет	1	6	8	Нет		Нет	Реконвалесцент
11971	ВАА	Неродств.	Нет	1	Нет	2	11	12	Нет		Виремия	Реконвалесцент
15918	ПИД	Неродств.	Нет	1	Да	1	3	4	Нет		Нет	Реконвалесцент
43763	ПИД	Гапло	Нет	0	Да	1	12	15	Да	Ретинит	Виремия	Реконвалесцент
25082	ПИД	Неродств.	Нет	0	Нет	1	1	2	Нет		Нет	Отторжение трансплантата
11108	ПИД	Гапло	Нет	0	Нет	1	2	3	Нет		Нет	Реконвалесцент
23729	ПАА	Неродств.	Нет	1	Нет	1	2	4	Нет		Нет	Реконвалесцент
38192	ПИД	Гапло	Да	1	Нет	2	12	14	Да	Ретинит	Нет	Реконвалесцент
24975	ПИД	Гапло	Нет	0	Нет	2	5	7	Нет		Виремия	Реконвалесцент
1340	ПАА	Неродств.	Нет	1	Нет	1	4	6	Нет		Нет	Отторжение трансплантата, смерть после повторной ТГСК
29321	ПИД	Неродств.	Нет	0	Нет	1	8	8	Да	БАЛ, моча	Нет	Смерть от инфекции
29048	ПИД	Неродств.	Нет	1	Да	1	2	4	Нет		Нет	Реконвалесцент

Рисунок 5

Динамика экспансии ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов после инфузии CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов у пациентов, не имевших ЦМВ-специфичных клеток до 1-й инфузии



Примечание: ЦМВ t_0 , ЦМВ t_1 , ЦМВ t_2 , ЦМВ t_3 — контрольные точки после ТГСК, в которых исследовали ЦМВ-реактивность (клеток/300 тыс. мононуклеарных клеток крови) методом ELISPOT.

Рисунок 6

Динамика максимального прироста ЦМВ-специфичных Т-лимфоцитов (клеток/300 тыс. мононуклеарных клеток крови) от момента точки t_0 (до ИДЛ № 1) до точки t_3 (+ 1 мес. после ИДЛ № 3)

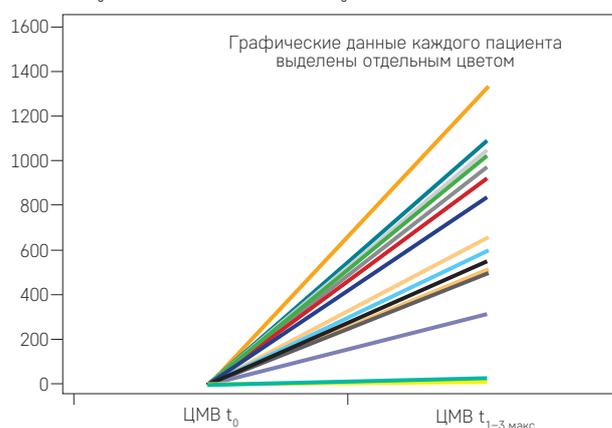
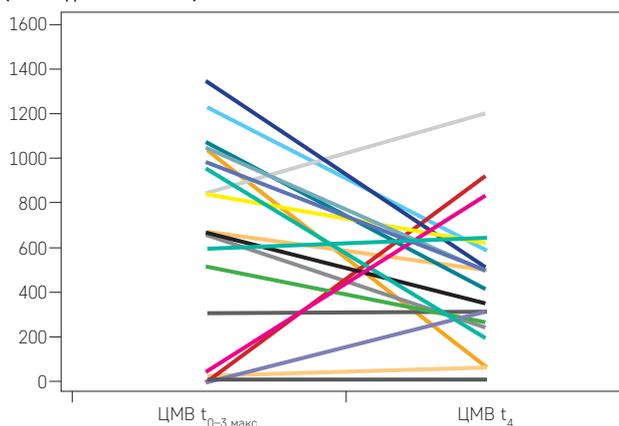


Рисунок 7

Персистенция ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов на момент t_4 (+1 год после ТГСК)



Примечание: ЦМВ $t_{0-3 макс.}$ – максимальное значение ЦМВ-специфических Т-лимфоцитов (клеток/300 тыс. мононуклеарных клеток крови) за период наблюдения до точки t_3 включительно (+120 после ТГСК); ЦМВ t_4 – число ЦМВ-специфических Т-лимфоцитов на момент точки t_4 (+1 год после ТГСК)

Таблица 6

Факторы, способные оказать влияние на появление ЦМВ-специфических Т-клеток к точке t_2 или t_3 , у пациентов, не имевших ЦМВ-реактивности в точке t_0 (n = 34)

Показатель	Пациенты с ЦМВ-реактивностью n = 16	Пациенты без ЦМВ-реактивности n = 17	p
	медиана (диапазон)	медиана (диапазон)	
Доза ЦМВ-Т в ИДЛ, кл/кг	30 (0–346)	7 (0–1279)	0,35
Доза $\alpha\beta$ -Т в трансплантате $\times 10^5$ /кг	22 (3–155)	35 (1–461)	0,66
$\gamma\delta$ CD3, количество перед ИДЛ № 1, кл/мкл	29 (0–97)	19(0–560)	0,76
$\gamma\delta$ CD3, количество перед ИДЛ № 2, кл /мкл	28(3–470)	8 (0–271)	0,21
Возраст донора, лет	34 (25–48)	28 (19–51)	0,165
Возраст пациента, лет	6 (1–22)	3 (1–18)	0,154
CD19+ в трансплантате	69 (2–1486)	215 (32–2330)	0,036
			p
			Тест Фишера
ЦМВ-виремия, n (%)	12 (16)	3 (17)	0,006
Тип донора (гапло:совместимые)	5:11	4:13	0,7
Пол донора, м:ж	8:8	10:7	0,73
Иммуносупрессия после DLI, да:нет	10:6	12:5	1,0
Химеризм по CD3+ в t_0 (< 0% собственных: >10% собственных)	12:4	11:6	0,75
Химеризм общий в t_0 (< 10%собственных: > 10% собственных)	14:3	14:2	1
Химеризм по CD3+ в t_1 (< 10% собственных: > 10% собственных)	11:5	9:8	0,35
Химеризм общий в t_1 (< 10% собственных: > 10% собственных)	12:4	16:1	0,3

Рисунок 8

Становление патоген-специфического иммунного ответа на примере пациента, у которого был отмечен позитивный титр ЦМВ-специфических лимфоцитов с t_1 (после ИДЛ № 1) и в дальнейших контрольных точках вплоть до +1 года после ТГСК

Пациент 24975	t_0 03.10.2016	t_1 31.10.2016	t_2 28.11.2016	t_3 16.01.2017	t_4 13.09.2017
ЦМВ					
Положительный контроль					
Отрицательный контроль					

ЦМВ-специфических Т-лимфоцитов в ИДЛ составляла 30 клеток/кг (от 0 до 346 клеток) против 7 клеток/кг (от 0 до 1279 клеток) у пациентов, в крови которых ЦМВ-специфические лимфоциты не обнаружены (тест Манна-Уитни, $p = 0,35$).

Исследуемые факторы, способные оказать влияние на появление ЦМВ-специфических Т-клеток, представлены в таблице 6. На момент t_4 (через 1 год после трансплантации) наблюдались 28 (85%) пациентов; 18 (64%) из них имели ЦМВ-реактивность (рисунок 7). Общие данные мониторинга патоген-специфической реактивности у всех пациентов исследуемой группы суммированы в таблице 7.

Становление ЦМВ-специфического клеточного иммунного ответа (на примере одного из пациентов исследуемой группы) отражено на рисунке 8. По данным ELISPOT-исследования крови пациента в контрольных точках, привлекает внимание появляющаяся со 2-й контрольной точки постоянная ЦМВ-Т-реактивность.

Общая иммунореактивация. Темп количественного восстановления основных субпопуляций лимфоцитов у пациентов исследуемой группы при сравнении с другой когортой больных, также перенесших аллогенную ТГСК с деплецией $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов, не имел значимых отличий [6, 7].

Клинические исходы. Два пациента умерли вследствие течения тяжелых вирусных инфекций через 78 и 96 дней после ТГСК (9 и 13 дней после ИДЛ № 3 соответственно). Кумулятивная вероятность трансплантационной смертности составила 4% (95% ДИ: 1–15) (рисунок 9). В обоих случаях непосредственной причиной смерти стала прогрессирующая неконтролируемая вирусная болезнь (ЦМВ, ЦМВ + АДВ). У обоих пациентов вирус-специфические лимфоциты не были

Таблица 7

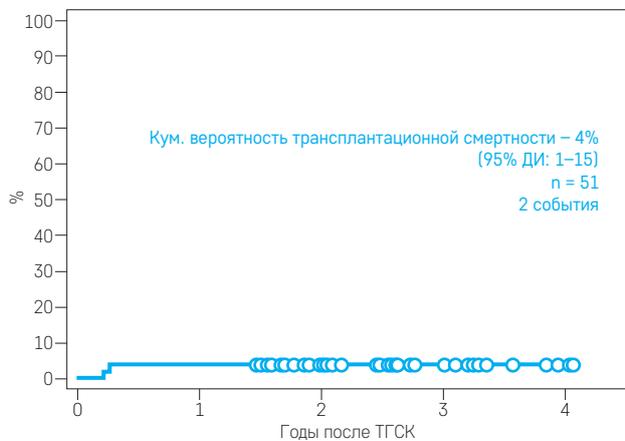
Общие данные мониторинга патоген-специфической реактивности в динамике (вся группа, n = 51)

Показатель	Точка t ₀	Точка t ₁	Точка t ₂	Точка t ₃	Точка t ₄
День анализа после ТГСК, медиана	+32 (17–91)	+61 (48–133)	+96 (73–153)	+150 (86–204)	+370 (333–502)
Элиспот к ЦМВ, n	49	47	41	39	28
‡ЦМВ-Т пол., n (%)	9 (18)	17 (36)	19 (46)	19 (49)	18 (64)
§ЦМВ-Т отр., n (%)	40 (82)	30 (64)	22 (54)	20 (51)	10 (36)
ЦМВ-Т кл/3* × 10 ⁵ МНС, медиана	0 (0–829)	0 (0–1096)	3 (0–1226)	29 (0–1340)	242 (0–1200)
γδ Т лф. кл/мкл, медиана	37 (0–560)	22 (0–916)	50 (3–1258)	430(2–750)	1039 (44–4287)
**Наивные Т-клетки, кл/мкл	–	1 (0–6)	4(0–17)	24 (0–146)	360 (2–2397)
Элиспот к АДВ, n	49	47	40	34	25
АДВ-Т пол., n (%)	2 (4)	8 (17)	9 (23)	10 (29)	9 (36)
АДВ-Т кл/3 × 10 ⁵ МНС, медиана	0 (0–588)	0 (0–145)	0 (0–446)	1 (0–398)	0 (0–68)
Элиспот к ЭБВ, n	49	47	40	34	25
ЭБВ-Т пол., n (%)	1 (2)	7 (15)	3 (8)	6 (18)	8 (32)
ЭБВ-Т кл/3 × 10 ⁵ МНС, медиана	0 (0–8)	0 (0–220)	0 (0–1265)	0 (0–1444)	0 (0–529)

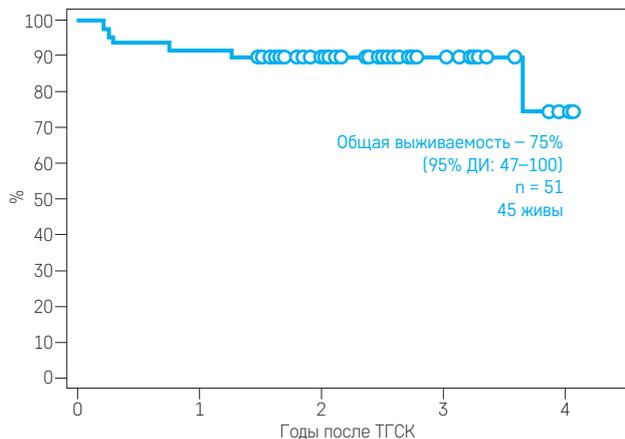
* Точки: t₀ – перед ИДЛ № 1; t₁ – перед ИДЛ № 2; t₂ – перед ИДЛ № 3; t₃ – 30 дней после ИДЛ № 3; t₄ – +1 год после ТГСК; ‡ ЦМВ (АДВ, ЭБВ)-Т пол. – уровень > 5 спотов/300 000 МНС, по данным ELISPOT; § ЦМВ(АДВ, ЭБВ)-Т отр. – уровень 0–5 спотов /300 000 МНС, по данным ELISPOT; ** наивные Т-лф – CD3+CD45RA+CD197+; МНС – мононуклеарные клетки крови.

Рисунок 9

Кумулятивная вероятность трансплантационной смертности (не связанной с прогрессией основного заболевания) у всей группы пациентов

**Рисунок 10**

Общая выживаемость у всей группы пациентов

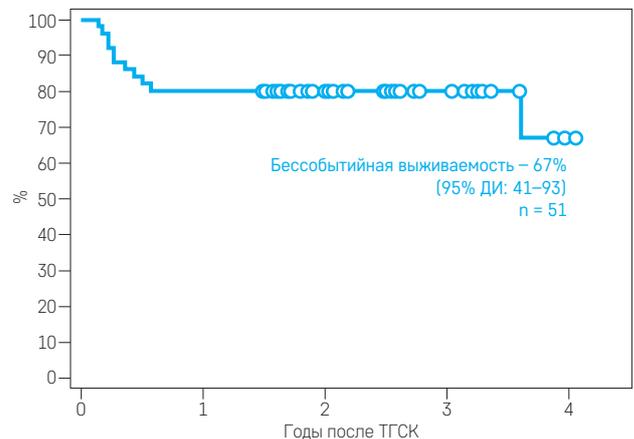


обнаружены ни в одной контрольной точке. Ретроспективный анализ аликвот пациентов на предмет ЦМВ- и АДВ-специфичных лимфоцитов также показал отрицательный результат. Одна пациентка с врожденным дискератозом умерла через 3,5 года после ТГСК вследствие прогрессии сердечно-легочной недостаточности в рамках гепатопульмонального синдрома. Трое пациентов умерли после повторной ТГСК, проводимой по поводу отторжения трансплантата.

Общая выживаемость на сроке 2 года от ТГСК для всей группы составила 90% (95% ДИ: 82–98) (рисунок 10). Бесобытийная выживаемость на сроке 2 года от ТГСК составила 80% (95% ДИ: 69–91) (рисунок 11).

Рисунок 11

Бесобытийная выживаемость у всей группы пациентов (событие – рецидив основного заболевания и смерть от любой причины)



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящего исследования была оценка безопасности и потенциальной эффективности введения низких доз донорских Т-лимфоцитов, очищенных от наивных (CD45RA+) клеток. Несмотря на то что потенциал аллореактивности фракции Т-клеток памяти значительно снижен, по данным нескольких исследований [19, 21], перекрестная реактивность репертуара Т-клеток памяти в отношении аллогенных антигенов системы HLA – известный феномен [25–29]. В клинической практике потенциал Т-клеток памяти в плане индукции РТПХ остается неизученным. Опубликованный клинический опыт свидетельствует о том, что удаление пула наивных Т-клеток не отменяет полностью риск РТПХ [17, 18, 30, 31], хотя и снижает риск развития тяжелых ее форм. По нашим данным, дополнительные инфузии Т-клеток памяти в дозах до $100 \times 10^3/\text{кг}$ для реципиентов гаплоидентичных ТГСК и до $300 \times 10^3/\text{кг}$ в случае трансплантаций от неродственных совместимых доноров связаны с низким риском возникновения РТПХ *de novo*.

Мониторинг ЦМВ-реактивных Т-клеток указывает на то, что при стимуляции антигеном содержание соответствующих реактивных Т-клеток интенсивно нарастает. Источником восстановления ЦМВ-специфичных клонов могут быть: 1) остаточные ЦМВ-специфичные клетки памяти в первичном трансплантате; 2) ЦМВ-специфичные Т-лимфоциты памяти в ИДЛ; 3) наивные донорские Т-клетки, продуцированные *de novo* и 4) Т-лимфоциты реципиента у пациентов со смешанным Т-клеточным химеризмом. Наш анализ показал, что появление наивных Т-клеток, так же как и сохранение реципиентских Т-клеток, практически не коррелирует с эффективной регенерацией клеточного иммунного ответа против ЦМВ. Хотя и невозможно полностью дифференцировать источник появления анти-ЦМВ иммунного ответа между клетками, полученными из первичного трансплантата и перенесенными посредством дополнительных инфузий Т-клеток памяти, косвенные данные свидетельствуют о том, что роль ИДЛ значительно превалирует. Следует отметить, что о клинически значимой генерации противовирусного иммунного ответа можно судить при наличии не менее чем 10 патоген-реактивных клеток на 300 тыс. мононуклеаров крови. У одной пациентки, у которой произошла 2-я реактивация ЦМВ до 2 тыс. коп./мл на +80-е сутки после ТГСК, имевшей удовлетворительную ЦМВ-реактивность по данным ELISPOT (100 ЦМВ-специфичных лимфоцитов), ЦМВ-виремия была купирована в течение 2 недель без применения лекарственной

противовирусной терапии. Несмотря на отсутствие достоверной корреляции между количеством трансфузируемых вирус-специфических лимфоцитов и вирус-специфической реактивностью, на основании результатов настоящего анализа можно предположить, что низкое содержание вирус-специфических клеток в ИДЛ служит негативным прогностическим фактором в случае присоединения резистентной вирусной инфекции. В целом наши данные свидетельствуют о том, что введение донорских лимфоцитов памяти после приживления трансплантата безопасно при диапазоне доз $25\text{--}100 \times 10^3/\text{кг}$ массы тела реципиента по CD3+ в случае гаплоидентичной ТГСК и $100\text{--}300 \times 10^3/\text{кг}$ в случае неродственной совместимой ТГСК с TCR- $\alpha\beta$ -деплецией как у когорты больных, трансплантированных по поводу злокачественного поражения гемопоэтической ткани [24], так и у группы пациентов в нашем исследовании. Оценивая сроки активации ЦМВ-инфекции (до 1-го введения клеток памяти она произошла у 73% пациентов), для эффективного использования в качестве профилактической меры представляется необходимым, чтобы инфузии Т-лимфоцитов памяти проводились рано, предпочтительно как часть первичного трансплантата. Однако иммуносупрессивная профилактика, традиционно проводимая до +60-го дня, может снижать эффективность ИДЛ у таких больных. Для подтверждения эффективности данной технологии как терапевтической либо профилактической опции необходимо проведение рандомизированного проспективного исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы выражают благодарность компании «Амджен» и благотворительному фонду «Подари жизнь».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Blagov S.L. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8754-1376>
Shelikhova L.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0520-5630>
Balashov D.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2689-0569>
Osipova E.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1873-3486>
Efimenko M.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3001-4820>
Khripkova N.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3001-4820>
Muzalevskiy J.O. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3513-8299>
Dunaikina M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1384-1752>
Pershin B.S. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6481-8608>
Maschan A.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>
Maschan M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература

1. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. – М.: МИА, 2003, 912 с.
2. Chaleff S., Otto M., Barfield R.C., Leimig T., Iyengar R., Martin J., et al. A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy* 2007; 9(8): 746–54. Doi: 10.1080/14653240701644000
3. Handgretinger R. Negative depletion of CD3(+) and TcRalphabeta(+) T-cells. *Curr Opin Hematol* 2012; 19 (6): 434–9. Doi: 10.1097/MOH.0b013e3283582340
4. Schumm M., Lang P., Bethge W., Faul C., Feuchtinger T., Pfeiffer M., et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* 2013; 15(10): 1253–8. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.014
5. Bertaina A., Merli P., Rutella S., Pagliara D., Bernardo M.E., Masetti R., et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of alphabeta+ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood* 2014; 124(5): 822–6. Doi: 10.1182/blood-2014-03-563817
6. Balashov D., Shcherbina A., Maschan M., Trakhtman P., Skvortsova Y., Shelikhova L., et al. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCRalphabeta and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (11): 1955–62. Doi: 10.1016/j.bbmt.2015.07.008
7. Maschan M., Shelikhova L., Ilushina M., Kurnikova E., Boyakova E., Balashov D., et al. TCR-alpha/beta and CD19 depletion and treosulfan-based conditioning regimen in unrelated and haploidentical transplantation in children with acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51(5): 668–74. Doi: 10.1038/bmt.2015.343
8. Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Tatari-nova O.V., Komech E.A., Kurnikova E.E., Boyakova E.V., et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCRalphabeta/CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia* 2016. Doi: 10.1038/leu.2016.321
9. Airoidi I., Bertaina A., Prigione I., Zorzoli A., Pagliara D., Cocco C., et al. gamma-madelta T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-alphabeta+/CD19+ lymphocytes. *Blood* 2015; 125: 2349–58.
10. Богдавленская А.А., Лаберко А.Л., Шелихова Л.Н., Шеховцова Ж.Б., Балашов Д.Н., Воронин К.А. и др. Герпес-вирусные инфекции у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с TCR $\alpha\beta$ и CD19 деплецией: факторы риска и прогноз. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017; 16 (1): 10–21.
11. Elfeky R., Shah R.M., Unni M.N.M., Ottaviano G., Rao K., Chiesa R., et al. New graft manipulation strategies improve the outcome of mismatched stem cell transplantation in children with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2019 Feb 4. pii: S0091-6749(19)30187–3. Doi: 10.1016/j.jaci.2019.01.030
12. Laberko A., Bogoyavlenskaya A., Shelikhova L., Shekhovtsova Z., Balashov D., Voronin K., et al. Risk Factors for and the Clinical Impact of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Infections in Pediatric Recipients of TCR-alpha/beta- and CD19-Depleted Grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016. Doi: 10.1016/j.bbmt.2016.12.635
13. Heslop H.E., Ng C.Y., Li C., Smith C.A., Loftin S.K., Krance R.A., et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T-lymphocytes. *Nat Med* 1996; 2(5): 551–5.
14. Papadopoulou A., Gerdemann U., Kataris U.L., Tzannou I., Liu H., Martinez C., et al. Activity of broad-spectrum T-cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med* 2014; 6 (242): 242–83. Doi: 10.1126/scitranslmed.3008825
15. Peggs K.S., Verfuert S., Pizzey A., Khan N., Guiver M., Moss P.A., et al. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 2003; 362 (9393): 1375–7. Doi: 10.1016/S0140-6736(03)14634-X
16. Schmitt A., Tonn T., Busch D.H., Grigoleit G.U., Einsele H., Odendahl M., et al. Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T-cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion* 2011; 51 (3): 591–9. Doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x
17. Bleakley M., Heimfeld S., Loeb K.R., Jones L.A., Chaney C., Seropian S., et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T-cell-depleted stem cell grafts. *J Clin Invest* 2015; 125 (7): 2677–89. Doi: 10.1172/JCI81229
18. Shook D.R., Triplett B.M., Eldridge P.W., Kang G., Srinivasan A., Leung W. Haploidentical stem cell transplantation augmented by CD45RA negative lymphocytes provides rapid engraftment and excellent tolerability. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62 (4): 666–73. Doi: 10.1002/pbc.25352
19. Teschner D., Distler E., Wehler D., Frey M., Marandiu D., Langeveld K., et al. Depletion of naive T-cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49 (1): 138–44. Doi: 10.1038/bmt.2013.114
20. Touzot F., Neven B., Dal-Cortivo L., Gabrion A., Moshous D., Cros G., et al. CD45RA depletion in HLA-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for primary combined immunodeficiency: A preliminary study. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(5): 1303–9 e1301–3. Doi: 10.1016/j.jaci.2014.08.019
21. Bleakley M., Heimfeld S., Jones L.A., Turtle C., Krause D., Riddell S.R., et al. Engineering human peripheral blood stem cell grafts that are depleted of naive T-cells and retain functional pathogen-specific memory T-cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20 (5): 705–16. Doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.032
22. Brodzki N., Turkiewicz D., Toporski J., Truedsson L., Dykes J. Novel treatment of severe combined immu-

- nodeficiency utilizing ex-vivo T-cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation and CD45RA+ depleted donor lymphocyte infusions. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 5. Doi: 10.1186/s13023-016-0385-3
23. Maschan M., Blagov S., Shelikhova L., Shekhovtsova Z., Balashov D., Starichkova J., et al. Low-dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted unrelated and haploidentical transplantation: results of a pilot trial. *Bone Marrow Transplant* 2018 Mar; 53 (3): 264–73. Doi: 10.1038/s41409-017-0035-y
24. Благов С.Л., Шелихова Л.Н., Осипова Е.Ю., Киселева В.В., Казаченок А.С., Шеховцова Ж.Б. Применение инфузий Т-клеток памяти с целью профилактики вирусных инфекций у пациентов с гемобластозами, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с деплецией α/β -Т-лимфоцитов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018, 17 (2): 9–20.
25. Przepiorka D., Weisdorf D., Martin P., Klingemann H.G., Beatty P., Hows J., et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15 (6): 825–8.
26. Melenhorst J.J., Leen A.M., Bollard C.M., Quigley M.F., Price D.A., Rooney C.M., et al. Allogeneic virus-specific T-cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood* 2010; 116 (22): 4700–2. Doi: 10.1182/blood-2010-06-289991
27. Melenhorst J.J., Scheinberg P., Williams A., Ambrozak D.R., Keyvanfar K., Smith M., et al. Alloreactivity across HLA barriers is mediated by both naive and antigen-experienced T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17 (6): 800–9. Doi: 10.1016/j.bbmt.2010.12.711
28. D'Orsogna L.J., Roelen D.L., Doxiadis I.I., Claas F.H. Alloreactivity from human viral specific memory T-cells. *Transpl Immunol* 2010; 23 (4): 149–55. Doi: 10.1016/j.trim.2010.06.008
29. D'Orsogna L.J., van der Meer-Prins E.M., Zoet Y.M., Roelen D.L., Doxiadis I.I., Claas F.H. Detection of allo-HLA cross-reactivity by virus-specific memory T-cell clones using single HLA-transfected K562 cells. *Methods Mol Biol* 2012; 882: 339–49. Doi: 10.1007/978-1-61779-842-9_19.
30. Triplett B.M., Shook D.R., Eldridge P., Li Y., Kang G., Dallas M., et al. Rapid memory T-cell reconstitution recapitulating CD45RA-depleted haploidentical transplant graft content in patients with hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50 (7): 968–77. Doi: 10.1038/bmt.2014.324
31. Jain N.A., Lu K., Ito S., Muranski P., Hourigan C.S., Haggerty J., et al. The clinical and financial burden of pre-emptive management of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation-implications for preventative treatment approaches. *Cytotherapy* 2014; 16 (7): 927–33. Doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.010

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 15.01.2019

Принята к печати 08.04.2019

Медико-частотные характеристики анемии Даймонда–Блекфена у детей в Российской Федерации

В.М. Чернов^{1, 2}, Г.С. Овсянникова¹, Н.Б. Юдина³, А.В. Рогов⁴, Н.Е. Соколова⁵, А.В. Шамин⁶, О.В. Сурьянинова⁷, И.И. Спичак⁸, Т.И. Бурлуцкая⁹, Л.А. Леandrova¹⁰, А.Н. Чижкова¹¹, Т.Л. Костюрина¹², И.М. Юнусова¹³, Ж.Х. Кумыкова¹⁴, М.В. Бурнацева¹⁵, Н.А. Попова¹⁶, А.П. Шапочник¹⁷, Е.Г. Бунина¹⁸, И.В. Пономарева¹⁹, Р.Х. Галиулин²⁰, Л.А. Мазурок²¹, Т.И. Ксензова²², И.И. Гушанская²³, В.Н. Фокин²⁴, В.Г. Стрелец²⁵, Е.М. Володичева²⁶, Е.Х. Цыденешева²⁷, Г.А. Новичкова¹, Н.С. Сметанина¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

³ БУЗ ВО «Воронежская областная детская клиническая больница №1», Воронеж

⁴ БУЗ СК «Краевая детская клиническая больница», Ставрополь

⁵ СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 1», Санкт-Петербург

⁶ БУЗ «Детская городская клиническая больница № 1 им. Н.Н. Ивановой», Самара

⁷ БУЗ ЯО «Областная детская клиническая больница», Ярославль

⁸ БУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница», Челябинск

⁹ ОГБУЗ «Детская областная клиническая больница», Белгород

¹⁰ БУЗ «Камчатская краевая больница им. А.С. Лукашевского», Петропавловск-Камчатский

¹¹ БУЗ РК «Коми республиканская больница», Сыктывкар

¹² БУЗ «Вологодская областная детская клиническая больница», Вологда

¹³ БУЗ РД «Детская республиканская клиническая больница им. Н.М. Кураева», Махачкала

¹⁴ БУЗ «Республиканская детская клиническая больница», Нальчик

¹⁵ БУЗ «Республиканская детская клиническая больница», Владикавказ

¹⁶ БУЗ «Волгоградский областной клинический онкологический диспансер № 1», Волгоград

¹⁷ БУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер», Оренбург

¹⁸ БУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница № 1», Кемерово

¹⁹ БУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск

²⁰ БУЗ ОО «Областная клиническая больница», Омск

²¹ БУЗ «Курганская областная клиническая больница», Курган

²² БУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1», Тюмень

²³ ГАУЗ «Брянская областная больница № 1», Брянск

²⁴ ОБУЗ «Ивановская областная клиническая больница», Иваново

²⁵ ОГБУЗ «Костромская областная клиническая больница», Кострома

²⁶ ГУЗ ТО «Тюльская областная клиническая больница», Тула

²⁷ ГАУЗ «Детская республиканская клиническая больница», Улан-Удэ

Анемия Даймонда–Блекфена (АДБ) – редкое, клинически и генетически гетерогенное заболевание из группы врожденных синдромов костномозговой недостаточности. Цель настоящей работы – выявление основных медико-частотных характеристик АДБ (заболеваемость, распространенность, летальность, картографический анализ) у детей в Российской Федерации; период наблюдения – 2011–2016 годы. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Для получения эпидемиологических данных и их анализа использован Российский регистр пациентов с АДБ, который разработан и ведется с 2012 года в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В конце 2018 года в регистр больных АДБ был включен 141 больной из 137 семей. Среднегодовой показатель заболеваемости детей, больных АДБ, на территории РФ составил $0,63 \pm 0,034$; среднегодовой показатель распространенности – $5,75 \pm 0,87$ на 100 тыс. новорожденных, рожденных живыми; показатель летальности – 2,12%. Картографический метод исследования показал, что наибольшее количество больных зарегистрировано в Центральном федеральном округе России, что объясняется высокой численностью населения, проживающего в этом округе.

Ключевые слова: дети, анемия Даймонда–Блекфена, регистр, эпидемиология, заболеваемость, распространенность, летальность, картографический анализ

Чернов В.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 22–28.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-22-28

Контактная информация:

Овсянникова Галина Сергеевна,
канд. мед. наук, врач-гематолог
стационара кратковременного
лечения, научный сотрудник отдела
оптимизации лечения
гематологических заболеваний
НМИЦ детской гематологии,
онкологии и иммунологии
им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: galina.ovsyannikova@fnkc.ru

© 2019 by NMRC PHOI

Received 15.01.2019

Accepted 08.04.2019

Epilemiological characteristics of Diamond–Blackfen anemia in pediatric population of the Russian Federation

V.M. Chernov^{1, 2}, G.S. Ovsyannikova¹, N.B. Yudina³, A.V. Rogov⁴, N.E. Sokolova⁵, A.V. Shamin⁶, O.V. Suriyaninova⁷, I.I. Spichak⁸, T.I. Burlutskaya⁹, L.A. Leandrova¹⁰, A.N. Chizhkova¹¹, T.L. Kostyurina¹², I.M. Yunusova¹³, Zh.Kh. Kumikova¹⁴, M.V. Burnatseva¹⁵, N.A. Popova¹⁶, A.P. Shapochnik¹⁷, E.G. Bunina¹⁸, I.V. Ponomareva¹⁹, R.Kh. Galiulin²⁰, L.A. Mazurok²¹, T.I. Ksenzova²², I.I. Gushchanskaya²³, V.N. Fokin²⁴, V.G. Strelets²⁵, E.M. Volodicheva²⁶, E.Kh. Tsedenisheeva²⁷, G.A. Novichkova¹, N.S. Smetanina¹

- ¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow
² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
³ Voronezh Regional Pediatric Clinic, Voronezh
⁴ Regional Pediatric Clinic, Stavropol
⁵ Pediatric City Hospital, Sankt-Petersburg
⁶ Pediatric City Clinical Hospital, Samara
⁷ Regional Pediatric Clinic, Yaroslavl
⁸ Chelyabinsk Regional Pediatric Clinic, Chelyabinsk
⁹ Pediatric Regional Clinic, Belgorod
¹⁰ Lukashovsky A.S. Kamchatka Regional Hospital, Petropavlovsk-Kamchatsky
¹¹ KOMI Republic Hospital, Syktyvkar
¹² Vologda Regional Pediatric Hospital, Vologda
¹³ Pediatric Republic Clinic, Makhachkala
¹⁴ Republic Pediatric Clinic, Nalchik
¹⁵ Republic Pediatric Clinic, Vladikavkaz
¹⁶ Volgograd Regional Oncological Center #1, Volgograd
¹⁷ Orenburg Regional Clinical Oncological Center, Orenburg
¹⁸ Kemerovo Regional Clinic #1, Kemerovo
¹⁹ City Novosibirsk Oncological Clinic, Novosibirsk
²⁰ Regional Clinic, Omsk
²¹ Kurgan Regional Clinic, Kurgan
²² Regional Clinic #1, Tyumen
²³ Bryansk Regional Hospital #1, Bryansk
²⁴ Ivanovo Regional Clinic, Ivanovo
²⁵ Kostroma Regional Hospital, Kostroma
²⁶ Tula Regional Clinic, Tula
²⁷ Pediatric Republic Clinic, Ulan-Ude

Diamond–Blackfan Anemia (DBA) is a rare, clinically and genetically heterogeneous disorder from the group of congenital syndromes of bone marrow failure. The purpose of this work is to identify the main medical-frequency characteristics of DBA (incidence, prevalence, mortality, cartographic analysis) in children in the Russian Federation during the observation period 2011–2016. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The Russian register of DBA patients, which had been developed and maintained since 2012 year by NMITS DGOI, was used to obtain epidemiological data and their analysis. At the end of 2018 year 141 patients from 137 families were included in the register. The average annual incidence rate of children with DBA for the Russian Federation was 0.63 ± 0.034 , the average annual prevalence rate – 5.75 ± 0.87 per 100 thousand newborns born alive; mortality rate – 2.12%; the cartographic method of research showed that the largest number of patients was registered in the Central Federal District of the country, which is explained by the high population living in this district.

Key words: children, Diamond–Blackfan anemia, register, epidemiology, morbidity, prevalence, mortality, cartographic analysis

Chernov V.M., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 22–28.
 DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-22-28

Correspondence:

Galina S. Ovsyannikova, MD, Hematologist at the Outpatient Department, Researcher in the Department of Hematology and Cell Technologies Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
 E-mail: galina.ovsyannikova@fnkc.ru

Анемия Даймонда–Блекфена (АДБ) представляет собой редкое, клинически и генетически гетерогенное заболевание из группы врожденных синдромов костномозговой недостаточности. Впервые это заболевание описал H.W. Josephs в 1936 году, а в 1938-м L.K. Diamond и K.D. Blackfan выделили его в самостоятельную нозологическую форму [1].

АДБ описана под многими названиями: парциальная красноклеточная аплазия, врожденная гипопластическая анемия, истинная эритроцитарная анемия, первичная красноклеточная болезнь, эритрогенезис имперфекта. В основе патогенеза заболевания лежит гаплоидная недостаточность рибосомальных генов, что обуславливает высокую проапоптотическую активность эритроидных предшественников, угнетение эритропоэза или гемопоэза в целом, наличие врожденных пороков развития у части пациентов, а также предрасположенность к развитию злокачественных новообразований [2–6].

Ранее считалось, что АДБ болеет 1 ребенок на 1 млн детей, рожденных живыми в год, в дальнейшем было показано, что АДБ встречается значительно чаще. В Великобритании для проведения исследований в области эпидемиологии, этиологии, патогенеза и лечения АДБ был создан регистр. Ретроспективный анализ 80 случаев АДБ у 33 лиц мужского пола и 47 – женского пола, родившихся

в Великобритании за 20 лет (1975–1994), показал, что заболеваемость составляет 5 случаев на 1 млн новорожденных, рожденных живыми [7].

По данным Шестой ежегодной клинической консенсусной конференции по АДБ [6], заболеваемость классической АДБ составляет около 7 случаев на 1 млн новорожденных, рожденных живыми, и диагностируется преимущественно на первом году жизни ребенка. По мере описания новых генетических мутаций диагностируются неклассические случаи АДБ с определенными фенотипами как у детей, так и у взрослых. Участники конференции отметили, что довольно часто в регистрах имеется неполная информация о больных, что затрудняет трактовку случая и подбор варианта лечения.

В Российской Федерации к редким (орфанным) болезням относятся заболевания с показателем заболеваемости не более 10 случаев на 100 тыс. детского населения в год [8]. После принятия этого закона начались работы по созданию федерального регистра редких болезней, регламентированные Постановлением Правительства РФ [9]. Ведение федерального регистра осуществляется Минздравом России, а ведение региональных сегментов регистра поручено уполномоченными органами исполнительной власти субъектов Российской Федерации. Федеральный регистр и региональные сегменты содержат следующую информацию о больных с

жизнеугрожающими редкими (орфанными) заболеваниями: фамилия, имя, отчество больного, дата рождения, пол, страховой номер, место жительства, номер и серия паспорта или свидетельства о рождении, сведения об инвалидности, диагноз, код по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, десятого пересмотра (МКБ-10) [10], сведения о выписке лекарственных препаратов, уникальный номер регистрационной записи и др. Данный регистр и его региональные сегменты позволяют организаторам здравоохранения повышать качество специализированной помощи, планировать средства на лечение больных, принимать правильные решения в руководстве отраслью.

В 2012 году в НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России был создан «Регистр детей, больных АДБ». В отличие от государственного, это клинический регистр, который содержит сведения о детях, заболевших АДБ, их паспортные данные, основные клинические проявления болезни, аномалии развития, методы лечения и их эффективность, исходы болезни. Регистр позволяет концентрировать сведения о больных, что особенно важно для изучения редких болезней и получения корректных выводов. Данные этого регистра позволяют проводить научно-исследовательскую работу, в том числе ретроспективные эпидемиологические исследования. Данные регистра больных АДБ использованы при проведении ретроспективных эпидемиологических исследований по изучению заболеваемости, распространенности, летальности среди детей в разных регионах страны и в целом по РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ретроспективное эпидемиологическое исследование проведено на базе детских гематологических отделений республиканских, краевых и областных больниц, Российской детской клинической больницы Минздрава России и Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НИИЦ ДГОИ.

В конце 2018 года в научной электронной базе регистра содержались данные о 141 пациенте из 137 семей, в том числе 11 семейных случаях. Соотношение мальчики:девочки – 1:1,1. «Классическая» клиническая картина заболевания выявлена у 118 пациентов. У 23 человек данных для проведения полного анализа оказалось недостаточно: отсутствовали сведения о фенотипических особенностях

пациента, трансфузионном анамнезе или проведенной ранее терапии [11].

Критерием включения пациентов в исследование было соответствие международным диагностическим критериям АДБ [6]: диагноз «классическая АДБ» устанавливается при наличии всех обязательных диагностических критериев. К бессимптомным носителям относили пациентов с наличием мутаций в генах рибосомальных белков без клинических и лабораторных проявлений заболевания.

Первичная диагностика заболевания осуществлялась с помощью международно признанных критериев постановки диагноза АДБ.

Критерии диагностики АДБ [6]

Обязательные диагностические критерии:

- возраст менее 1 года;
- макроцитарная анемия без других значимых цитопений;
- ретикулоцитопения;
- нормальная клеточность костного мозга с недостаточностью эритроидных предшественников (< 6%).

Дополнительные критерии:

Главные:

- мутация генов, описанная при «классической» АДБ (*RPS19*, *RPS10*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPS7*, *RPS17*);
- позитивный семейный анамнез.

Второстепенные:

- повышенная активность аденозиндезаминазы эритроцитов;
- врожденные аномалии, описанные при «классической» АДБ;
- повышенный фетальный гемоглобин (у детей старше 6 мес.).

Диагноз «классическая АДБ» ставят при наличии всех обязательных диагностических критериев. В МКБ-10 АДБ имеет рубрику D61.0 [10].

Наблюдаемые территории: Москва и Московская область, Санкт-Петербург и Ленинградская область; республики Бурятия, Дагестан, Кабардино-Балкария, Коми, Северная Осетия; края Ставропольский и Камчатский; области Белгородская, Брянская, Волгоградская, Вологодская, Воронежская, Ивановская, Кемеровская, Костромская, Курганская, Новосибирская, Омская, Оренбургская, Самарская, Тульская, Тюменская, Челябинская и Ярославская.

Период наблюдения составил 6 лет – с 2011 по 2016 год. Обследуемая популяция: детское городское и сельское население в возрасте от 0 до 15 лет, наблюдаемое педиатрической сетью – республиканскими, краевыми, областными, городскими больницами. Данные о численности новорожденных, рожденных живыми, получены на сайте Росстата (www.gks.ru).

Статистическая обработка данных. Расчет показателя заболеваемости производили по формуле:

$$Y = n \times 10^5 / N;$$

где Y – показатель заболеваемости; n – число выявленных случаев заболевания за год; N – среднегодовая численность населения исследуемой возрастной группы.

Показатель летальности рассчитывали по формуле:

$$L = M / N \times 100;$$

где L – показатель летальности в процентах; M – число случаев смерти от заболевания; N – общее число случаев заболевания за год или период наблюдения.

Показатель распространенности рассчитывали по формуле:

$$Y = n \times 10^5 / N;$$

где Y – показатель распространенности; n – общее число случаев заболевания, наблюдаемых в данном году вне зависимости от года диагностики заболевания; N – среднегодовая численность населения исследуемой возрастной группы.

Анализ тенденции изменения показателей (повышение или снижение) заболеваемости и распространенности АДБ проводили методом линейного регрессионного анализа с графическим построением линии тренда и приведением формулы тренда с помощью прикладной статистической программы *Statistical for Windows* на ПЭВМ.

Картографический метод анализа абсолютного количества детей, заболевших АДБ, в период анализа в территориальном аспекте предусматривает разделение на федеральные округа и нанесение полученных данных на географическую карту. Метод позволяет наглядно продемонстрировать различия в количестве детей, заболевших АДБ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В медицинской документации группы из 99 детей были прослежены следующие факты: установление диагноза АДБ до 12 мес. (обязательный диагностический критерий), регистрация ранней манифестации заболевания и начало заместительной терапии эритроцитной массой (таблица 1). Ранняя диагностика и начало лечения выявлены у 97 (97,9%) больных – это хороший показатель. Диагностика АДБ у детей старше 12 мес. отмечена только у 2 (2,1%) больных.

Среднегодовой показатель заболеваемости детей АДБ на территории РФ за период с 2011 по 2016 год составил $0,63 \pm 0,034$ случая (от 0,47 до 0,74 случая) на 100 тыс. новорожденных мальчиков и девочек, рожденных живыми (таблица 2). Оценка динамики показателя заболеваемости методом линейной регрессии с графическим построением линии тренда показала тенденцию к его увеличению (рисунок 1): наклон линии тренда составил $+0,5493$.

Среди вероятных причин роста показателя заболеваемости можно рассматривать улучшение диагностики АДБ. В исследование были включены случаи диагностики АДБ у детей до 2016 года. Представляет интерес прогноз заболеваемости на последующие годы, выполненный с помощью линейного регрессионного анализа (прогностическая часть тренда на 2017–2019 годы показана пунктиром на рисунке 1). Возможен дальнейший рост показателя заболеваемости АДБ у детей, что обосновывает продолжение эпидемиологических исследований на базе регистра.

Среднегодовой показатель заболеваемости АДБ – $0,63 \pm 0,034$ новых случая (от 0,47 до 0,74 случая) на 100 тыс. новорожденных, рожденных живыми

Таблица 1
Возраст детей, больных АДБ, к моменту диагностики процесса, по данным регистра (n = 99)

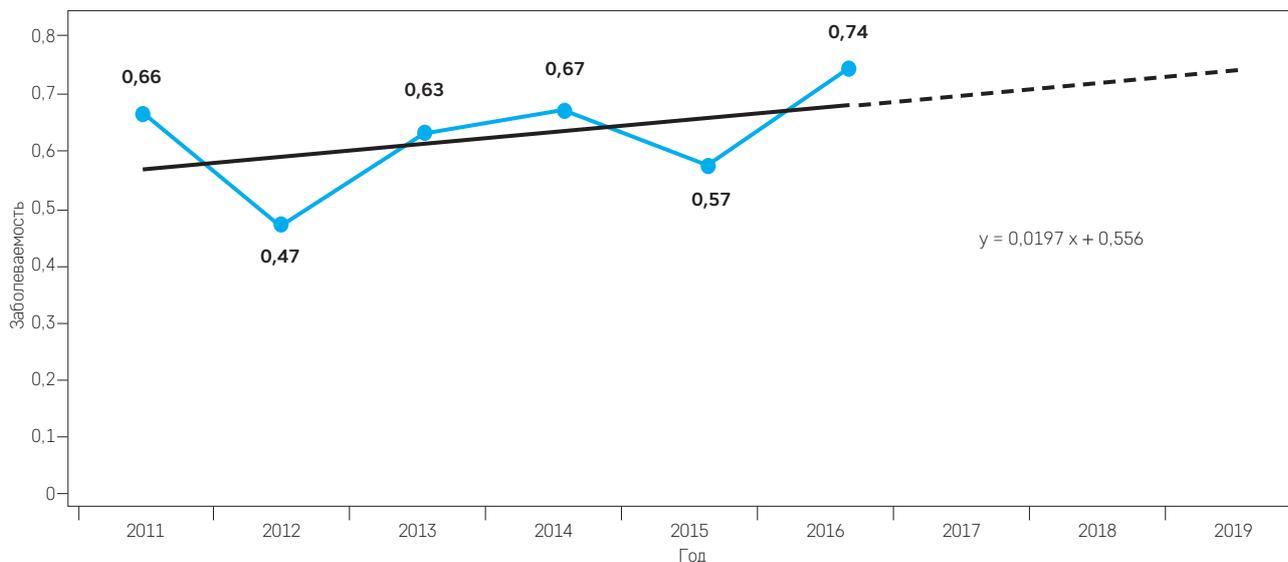
Возраст больных к моменту диагностики АДБ, мес.	Количество больных	
	абс.	%
0–1	39	38,3
1–3	33	33,3
3–12	26	26,3
> 12	2	2,1

Таблица 2
Абсолютное количество детей в России, заболевших АДБ в период наблюдения, и показатель заболеваемости на 100 тыс. детей, рожденных живыми

Год наблюдения	Количество детей, рожденных живыми в РФ	Абсолютное количество детей, заболевших АДБ	Показатель заболеваемости на 100 тыс. детей, рожденных живыми
2011	1 796 629	12	0,67
2012	1 902 084	9	0,47
2013	1 895 822	12	0,63
2014	1 942 683	13	0,67
2015	1 940 579	11	0,57
2016	1 893 256	14	0,74
$M \pm m$	$1 895 175,5 \pm 19 773,6$	$11,8 \pm 0,6$	$0,63 \pm 0,034$

Рисунок 1

Динамика показателя заболеваемости АДБ у детей в РФ в 2011–2016 годах, тренд заболеваемости, построенный методом линейной регрессии, и прогностическая часть тренда на 2017–2019 годы (пунктир), на 100 тыс. новорожденных, рожденных живыми



ми, практически с одинаковым соотношением полов (1:1,1) – в целом соответствует статистическим данным европейских и Северо-Американского регистров АДБ [12–14].

Летальность представляет собой локальный показатель в характеристике какого-либо заболевания и принадлежит конкретному отделению, больнице, регистру, то есть не является популяционным. В регистре больных АДБ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева за период анализа зарегистрированы три смертельных исхода в группе наблюдаемых больных ($n = 141$); показатель летальности – 2,12%. Один пациент умер от сердечной недостаточности в возрасте 24 лет вследствие посттрансфузионной пере-

грузки железом; одна пациентка – в возрасте 12 лет от септического шока (возбудитель неизвестен) на фоне эффективной терапии глюкокортикостероидами (метилпреднизолоном) без профилактического приема триметоприма; один случай летального исхода зарегистрирован на +21-й день после гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от матери в результате септического шока синегнойной этиологии. Низкий показатель летальности свидетельствует об эффективности современных опций лечения АДБ у детей (заместительная терапия, лечение глюкокортикостероидами, L-лейцином, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, хелаторная терапия).

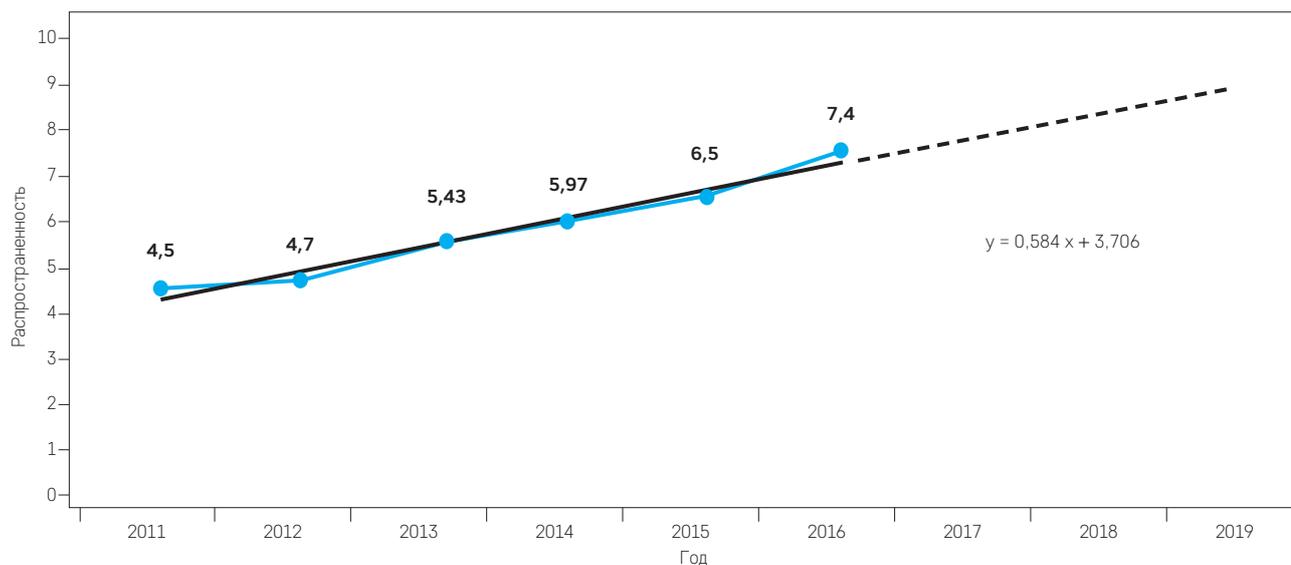
Таблица 3

Абсолютное количество детей в России, зарегистрированных в регистре на начало и конец каждого года периода наблюдения, и показатель распространенности на 100 тыс. детей, рожденных живыми

Год наблюдения	Число детей, рожденных живыми	Количество случаев АДБ в регистре на начало года	Абсолютное количество детей, больных АДБ	Количество случаев АДБ в регистре на конец года	Показатель распространенности на 100 тыс. детей, рожденных живыми
2011	1 796 629	70	12	82	4,5
2012	1 902 084	82	9	91	4,7
2013	1 895 822	91	12	103	5,43
2014	1 942 683	103	13	116	5,97
2015	1 940 579	116	11	127	6,5
2016	1 893 256	127	14	141	7,4
$M \pm m$	$1 895 175,5 \pm 19 773,6$		$11,8 \pm 0,6$		$5,75 \pm 0,87$

Рисунок 2

Динамика показателя распространенности АДБ у детей в России в 2011–2016 годах; тренд показателя распространенности, построенный методом линейной регрессии, и прогностическая часть тренда на 2017–2019 годы (пунктир), на 100 тыс. новорожденных, рожденных живыми

**Рисунок 3**

Картографический анализ распределения абсолютных случаев АДБ у детей в федеральных округах РФ в период наблюдения (n = 137)



Примечание: ЦФО – Центральный Федеральный округ (ФО); СЗФО – Северо-Западный ФО; УФО – Уральский ФО; СФО – Сибирский ФО; ДФО – Дальневосточный ФО; ПФО – Приволжский ФО; ЮФО – Южный ФО; СКФО – Северо-Кавказский ФО.

Тенденция к увеличению у детей показателя заболеваемости АДБ, зарегистрированная за период наблюдения, и низкий показатель летальности позволяли предположить рост распространенности заболевания. Абсолютное количество детей в России, зарегистрированных в регистре на начало и конец каждого года периода наблюдения, и показатель распространенности АДБ на 100 тыс. детей, рожденных живыми, представлены в таблице 3. В 2011 году, до начала исследования, в регистре насчитывалось 70 больных АДБ. В последующий период наблюдения (2011–2016 годы) в регистр ежегодно добавлялось от 9 до 14 больных (в среднем $11,8 \pm 0,6$); к концу периода наблюдения общее количество детей, больных АДБ и зарегистрированных в регистре, составило 141 человек. Показатель распространенности АДБ у детей колебался от 4,5 до 7,4 случая на 100 тыс. новорожденных детей, рожденных живыми. Среднего-

довой показатель распространенности АДБ за период наблюдения составил $5,75 \pm 0,87$ случая на 100 тыс. новорожденных детей, рожденных живыми. Динамика показателя распространенности АДБ у детей в РФ в 2011–2016 годах, тренд показателя распространенности, построенный методом линейной регрессии (на 100 тыс. новорожденных, рожденных живыми), представлены на рисунке 2. Выявлена тенденция к устойчивому увеличению показателя распространенности АДБ у детей, что свидетельствует об эффективном лечении и накоплении популяции больных.

Выявленное с помощью картографического анализа распределение пациентов с АДБ по федеральным округам (ФО) РФ представлено на рисунке 3. Как и следовало ожидать, пациентов с АДБ больше в наиболее густонаселенных регионах страны. В Центральном ФО выявлено наибольшее количество детей, больных АДБ, – 52 пациента; на 2-м рангом месте – Северо-Западный ФО – 16 случаев; на 3-м месте – Приволжский ФО, где зафиксировано 15 случаев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые созданный в России клинический регистр детей, больных АДБ, позволил собрать уникальный материал (141 случай), важный для изучения редких заболеваний. В пополнении регистра приняли участие главные специалисты всех федеральных округов РФ. На базе регистра были проведены ретроспективные эпидемиологические исследования по изучению основных частотных характеристик – заболеваемости, распространенности и летальности при АДБ. Сравнение этих характеристик с зарубежными данными показало их сопоставимость. Полученные

эпидемиологические сведения о заболеваемости и распределении пациентов по федеральным округам РФ необходимы для определения объема медицинской помощи детям с АДБ. Показано, что в лечении детей с АДБ в России применяются все существующие сегодня в медицине методы лечения – глюкокортикоиды, пожизненная заместительная терапия эритроцитарной массой в сочетании с хелаторной терапией, лечение L-лейцином, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и др. Об эффективности этих методов лечения свидетельствуют увеличение показателя распространенности и низкий показатель летальности детей, больных АДБ. В детском возрасте АДБ является курабельным заболеванием.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Sokolova N.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1021-7348>

Shamin A.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7690-8718>

Spichak I.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5730-4767>

Shapochnik A.P. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0630-9618>

Novichkova G.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Smetanina N.S. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8805-1499>

Литература

- Diamond L.K., Blackfan K.D. Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child*, 1938; 56: 464–7.
- Lipton J.M., Kudisch M., Gross R., Nathan D.G. Defective erythroid progenitor differentiation system in congenital hypoplastic (Diamond–Blackfan) anemia. *Blood*, 1986; 67(4): 962–8.
- Perdahl E.B., Naprstek B.L., Wallace W.C., Lipton J.M. Erythroid Failure in Diamond–Blackfan anemia is characterized by apoptosis. *Blood*, 1994; 83:645–50.
- Gripp K.W., McDonald-McGinn D.M., La Rossa D., McGain D., Federman N., Vlachos A., et al. Bilateral microtia and cleft palate in cousins with Diamond–Blackfan anemia. *Am J Med Genet*, 2001; 101: 268–74.
- Campagnoli M.F., Garelli E., Quarello P., Carando A., Varotto S., Nobili B., Longoni D., Pecile V., Zecca M., Dufour C., Ramenghi U., Dianzan I. Molecular basis of Diamond–Blackfan anemia: New findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica*, 2004; 89:480–9.
- Vlachos A., Ball S., Dahl N., Alter B.P., Sheth S., Ramenghi U., et al. Participants of Sixth Annual Daniella Maria Arturi International Consensus Conference. Diagnosing and treating Diamond–Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 2008 Sep; 142(6): 859–76.
- Ball S.E., McGuckin C.P., Jenkins G., Gordon-Smith E.C. Diamond–Blackfan anaemia in the U.K.: analysis of 80 cases from a 20-year birth cohort. *Br J Haematol* 1996 Sep; 94(4): 645–53.
- Федеральный закон №323ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» от 21.11.2011 г. с изменениями от 25.06.2012 г. ст.44 «Медицинская помощь гражданам, страдающим редкими (орфанными) заболеваниями».
- Постановление Правительства РФ от 26 апреля 2012 г. № 403 «О порядке ведения Федерального регистра лиц, страдающих жизнеугрожающими редкими (орфанными) заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности, и его регионального сегмента». <http://base.garant.ru/70168888/>
- Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем. 10-й пересмотр. Женева, ВОЗ, 1995, том 1, часть 1, с. 216–22.
- Овсянникова Г.С., Молекулярно-генетическая характеристика и дифференцированная терапия детей с врожденной парциальной красноклеточной аплазией Даймонда–Блекфена/Автореф. канд. дисс. – М., 2018, 26 с.
- Campagnoli M.F., Garelli E., Quarello P., Carando A., Varotto S., Nobili B., Longoni D., Pecile V., Zecca M., Dufour C., Ramenghi U., Dianzan I. Molecular basis of Diamond–Blackfan anemia: New findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica*, 2004; 89: 480–9.
- Lipton J.M., Atsidaftos E., Zyskind I., Vlachos A. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond–Blackfan anemia: An update from the Diamond–Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood & Cancer*, 2006; 46: 558–64.
- Willig T.N., Niemeyer C.M., Leblanc T., Tiemann C., Robert A., Budde J., et al. Identification of new prognosis factors from the clinical and epidemiologic analysis of a registry of 229 Diamond–Blackfan anemia patients. DBA group of Société d'Hématologie et d'Immunologie Pédiatrique (SHIP), Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), and the European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI). *Pediatr Res*, 1999; 46(5): 553–61.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-29-34

Особенности гемостаза у детей с врожденными пороками сердца в первые 12 часов жизни

О.В. Шумакова¹, Н.Я. Морозова¹, А.А. Буров¹, Ю.Л. Подуровская¹, Е.Л. Бокерия¹,
И.Е. Нефедова², Д.О. Беришвили², Д.Н. Дегтярев^{1,3}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Минздрава России, Москва

³ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

Исследованы показатели фибриногена, протромбина по Квику, АЧТВ, протеина С, антитромбина III, D-димера, а также число тромбоцитов у новорожденных детей с врожденными пороками сердца в первые 12 часов жизни, которым могла потребоваться ранняя кардиохирургическая коррекция. Приведен клинический пример развития тромботических осложнений у ребенка после кардиохирургической операции, описана тактика проведенной медикаментозной терапии. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова.

Ключевые слова: гемостаз, новорожденные, врожденные пороки сердца, ранняя кардиохирургическая коррекция, нарушение системы свертывания крови

Шумакова О.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 29–34.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-29-34

Peculiarities of hemostasis in infants with congenital heart diseases in the first 12 hours of their life

O.V. Shumakova¹, N.Ya. Morozova¹, A.A. Burov¹, Yu.L. Podurovskaya¹, E.L. Bockeriya¹, I.E. Nefedova²,
D.O. Berishvily², D.N. Degtyarev^{1,3}

¹ V.I. Kulakov Obstetrics, Gynecology and Perinatology Research Centre of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

² A.N. Bakulev National Cardiovascular Surgery Centre of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³ Sechenovskiy University, Moscow

The article is focused on the main parameters hemostasis and platelet count of newborns with congenital heart diseases who could require an early cardiac surgery during the first 12 hours of their life. Some known disorders of hemostasis in children with congenital heart diseases are described. A clinical case of the thrombotic complications in the child after cardiac surgery are presented, the tactic of drug therapy is described. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the V.I. Kulakov Obstetrics, Gynecology and Perinatology Research Centre.

Key words: hemostasis, newborns, congenital heart disease, early heart surgery, blood clotting disorder

Shumakova O.V., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 29–34.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-29-34

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 09.07.2018

Принята к печати 11.02.2019

Контактная информация:

Шумакова Оксана Витальевна, врач отделения патологии новорожденных и недоношенных детей № 2, аспирант кафедры неонатологии и педиатрии НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4.
E-mail: shumakova-ok@yandex.ru

© 2019 by NMRC PHOI

Received 09.07.2018

Accepted 11.02.2019

Correspondence:

Oksana V. Shumakova, Postgraduate, Neonatologist. V.I. Kulakov Obstetrics, Gynecology and Perinatology Research Centre of Ministry of Healthcare of the Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow, Academician Oparin st., 4.
E-mail: shumakova-ok@yandex.ru

Новорожденные с критическими пороками сердца составляют группу высокого риска по развитию летальных осложнений как до, так и после кардиохирургического вмешательства. Летальность детей от осложнений, ассоциированных с нарушениями гемостаза, в раннем неонатальном периоде достигает 16,5% [1–3]. Выявление особенностей системы свертывания крови в первые сутки жизни поможет разработать стратегию своевременной коррекции нарушений гемостаза и снизить частоту развития подобных осложнений.

По данным литературы известно, что в норме у детей в первые сутки жизни имеется прокоагуляционная направленность гемостаза [4, 5]. Однако

в зависимости от особенностей внеутробной адаптации (стрессовая катехоламинемия, физиологическая полицитемия, транзиторная гипокальциемия, функционирование фетальных коммуникаций, тканевая перфузия с более высоким содержанием кислорода по сравнению с внутриутробной циркуляцией, транзиторная активация гликолиза) может отмечаться склонность как к гиперкоагуляции, так и к гипокоагуляции [4–6]. Уровень тромбоцитов у здоровых новорожденных в первые сутки жизни существенно не отличается от такового у детей других возрастных групп. Активность витамин-К-зависимых факторов свертывания крови в первые сутки жизни снижена по сравнению с таковой у детей грудного возраста, что

проявляется гипокоагуляцией по внутреннему (АЧТВ) и внешнему механизму свертывания (протромбин по Квику). Уровень фибриногена у здоровых новорожденных не изменяется в течение неонатального периода [5].

Патологические изменения гемостаза запускаются по известным механизмам: нарушение целостности сосудистой стенки, наличие турбулентного тока крови, изменение «гемостатического баланса» между факторами «свертывающей» и «противосвертывающей» систем. Одним из важных факторов, способствующих запуску механизмов активации или ингибирования системы свертывания крови, является нарушение центральной и региональной гемодинамики, обусловленное врожденным пороком сердца.

К общим закономерностям нарушений гемодинамики наиболее распространенных врожденных пороков сердца (ВПС) относится наличие сброса или затруднения оттока крови на уровне порока (при любых обструктивных поражениях крупных сосудов, выводящих отделов желудочков, при наличии септальных дефектов) [7–9]. Данные особенности гемодинамики, вероятно, могут влиять на систему свертывания крови новорожденных с ВПС, являясь одним из патогенетических механизмов нарушения реологических свойств крови, что определило цель нашего исследования.

Кроме того, согласно исследованиям особенностей системы гемостаза детей с цианотичными ВПС доказано, что артериальная гипоксемия повышает свертываемость крови за счет компенсаторных механизмов увеличения объема циркулирующей крови, гемоглобина, эритроцитов, что создает в организме благоприятные условия для тромбообразования [10, 11]. Согласно международной хирургической номенклатуре врожденных пороков сердца к цианотичным ВПС относятся следующие пороки: тетрада Фалло, общий артериальный ствол, атрезия трехстворчатого клапана, транспозиция магистральных сосудов, тотальный аномальный дренаж легочных вен [12].

Опубликовано множество работ, посвященных изучению гемостаза у новорожденных с ВПС, но исследований гемостаза у этой категории новорожденных в первые часы жизни не проводили, несмотря на то что критические ВПС требуют ранней кардиохирургической коррекции. Выявление основных закономерностей системы свертывания крови новорожденных с различными ВПС, особенно критическими, позволит на этапе родильного дома или перинатального центра прогнозировать нарушения гемостаза в периперационном периоде у данной категории пациентов.

Цели исследования: поиск предикторов нарушений свертываемости крови у детей с ВПС в первые 12 часов жизни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе отделения хирургии новорожденных Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России с января по ноябрь 2017 года выполнено проспективное исследование особенностей системы свертывания крови новорожденных с ВПС первых 12 часов жизни, которым могли потребоваться ранняя кардиохирургическая коррекция. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова.

В исследуемую группу были включены 24 новорожденных (15 – мальчики, 9 – девочки) с ВПС, которые, по результатам проведенных обследований (динамический пре- и постдуктальный мониторинг систолического артериального давления и сатурации, ЭХО-КГ) и предварительному заключению врача-кардиолога, могли нуждаться в раннем оперативном лечении. Цианотичные ВПС были диагностированы у 10 из 24 исследуемых новорожденных. У всех детей исследуемой группы пороки развития сердца были диагностированы внутриутробно и подтверждены постнатально по результатам ЭХО-КГ с доплерометрией центрального кровотока. Ультразвуковое исследование (УЗИ) всем новорожденным проводили на ультразвуковом аппарате экспертного класса *SIEMENS Acuson S2000* (Германия). Особенность анатомии всех ВПС у исследуемых детей предполагала необходимость ранней кардиохирургической коррекции.

Всем детям, участвующим в исследовании, помимо стандартного лабораторного (общий анализ крови), было проведено гемостазиологическое обследование (определение показателей фибриногена, протромбина по Квику, АЧТВ, антитромбина III, D-димера). Забор крови для оценки состояния гемостаза у новорожденных проводили сразу после рождения до проведения хирургического лечения, но после оказания первичной реанимационной помощи и введения витамина K_1 в профилактической дозе – 1 мг/кг, внутримышечно (в первые 12 ч жизни). Терапия, влияющая на показатели фибриногена, АЧТВ, протромбина по Квику, D-димера, антитромбина III, в первые сутки жизни у детей исследуемой группы не проводилась.

Показатели гемостаза и уровня тромбоцитов исследованных новорожденных были сопоставлены с референсными данными доношенных новорожденных первых суток жизни без соматической патологии, принятыми в клинко-диагностической лаборатории НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии

им. академика В.И. Кулакова Минздрава России (таблица 1).

Концентрацию фибриногена, АЧТВ, протромбин по Квику (%), показатели D-димера, активности антитромбина III определяли на автоматическом коагулометре *Sysmex CA-1500* (*Sysmex Corporation*, Япония) с использованием реагентов *Pathromtin®SL*, *Thromborel®S* и *INNOVANCE® D-Dimer*, *Berichrom®Antithrombin*, (*Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH*, Германия).

Беременность у матерей исследуемой группы детей протекала без существенных особенностей. Способом родоразрешения у 11 (45,8%) женщин была операция кесарева сечения; у 13 (54,2%) – самопроизвольные роды. Доношенными родились 22 (91,7%) из 24 детей; двое – поздние недоношенные. После рождения реанимационные мероприятия проводили 16 (66,7%) новорожденным. Оценка по шкале Апгар на 1-й мин (Me; R) – 6,5 (3–8); на 5-й мин (Me; R) – 7,5 (5–9) балла.

Таблица 1

Референтные значения показателей гемостазиограммы у новорожденных на 1–5-е сутки жизни

Показатель	Норма для новорожденных на 1–5-е сутки жизни	Единица измерения
Концентрация фибриногена	1,8–3,8	г/л
АЧТВ	35–60	сек
Протромбин по Квику	70–90	%
D-димер	170–1000	Мкг/л
Антитромбин III	40–85	%

Таблица 2

Показатели гемостазиограммы и уровня тромбоцитов у исследованных новорожденных с ВПС в первые 12 часов жизни

Показатель	(Me;R)
Фибриноген, г/л	2,06 (0,96–3,2)
Протромбин по Квику, %	63,7 (21,4–103,2)
АЧТВ, сек	48,15 (28,8–104,5)
Антитромбин III, %	47 (25,7–84,9)
D-димер, мкг/л	1271 (559–9999)
Тромбоциты × 10 ⁹ /л	304,5 (95–431)

Среди сопутствующих заболеваний у исследуемых новорожденных были диагностированы: у 1 (4,17%) – атрезия пищевода с нижним трахео-пищеводным свищом; у 1 (4,17%) – перинатальное гипоксически-геморрагическое поражение ЦНС (подоболочечные кровоизлияния с паренхиматозным пропитыванием); у 2 (8,3%) – гипоксически-ишемическое поражение ЦНС; у 3 (12,5%) – врожденная пневмония; у 9 (37,5%) – асфиксия средней или тяжелой степени при рождении; в 1 (4,17%) случае в раннем неонатальном периоде развился ДВС-синдром.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе оценки показателей гемостазиограммы и уровня тромбоцитов были получены следующие результаты (таблица 2).

Медиана большинства параметров – фибриногена, АЧТВ, количество тромбоцитов, основной естественный антикоагулянт (антитромбин III) – соответствовала нормативным значениям; медиана внешнего механизма свертывания (протромбин по Квику) была ниже референтных значений, а концентрация D-димера значительно превысила принятые нормативные показатели у новорожденных без соматической патологии [13, 14].

У большинства новорожденных с ВПС уровень фибриногена не выходил за пределы нормативных значений, только у 3 пациентов отметили снижение данного показателя – менее 1,5 г/л (рисунок 1, пациенты № 7, 18, 19). Клинических проявлений патологии гемостаза у данных новорожденных в первые сутки жизни и в периоперационном периоде не было. У детей со сниженным уровнем фибриногена были диагностированы нецианотичные ВПС.

Рисунок 1

Концентрация фибриногена у детей с ВПС в первые 12 часов жизни



Показатели протромбина по Квику (рисунк 2) у 15 и 24 исследуемых детей были ниже нормативных значений. Корреляции между снижением уровня протромбина по Квику и развитием каких-либо нарушений свертываемости крови в неонатальном периоде не отмечено.

Показатели АЧТВ у большинства новорожденных с ВПС соответствовали нормативным значениям (рисунк 3). Повышение АЧТВ отмечено у новорожденных с цианотичной формой ВПС (рисунк 3, пациенты № 3, 10, 12, 24); у 2 новорожденных было существенно повышено АЧТВ – более 90 сек (рисунк 3, пациенты № 10, 12). Интересно, что у новорожденных с существенным удлинением АЧТВ, по данным гемостазиограммы первых 12 ч жизни, было диагностировано перинатальное поражение ЦНС гипоксически-геморрагического генеза (рисунк 3, пациенты № 10, 12), однако в периоперационном периоде геморра-

гические осложнения у них не отмечены. Не было геморрагических осложнений и у остальных детей.

У части новорожденных с ВПС отметили снижение активности антитромбина III (рисунк 4). Данная группа детей преимущественно представлена новорожденными с нецианотичными ВПС (рисунк 4, пациенты № 5, 7, 10, 20). У пациента № 10 диагностировали перинатальное поражение ЦНС гипоксически-геморрагического генеза, однако при проведении хирургической коррекции порока и в послеоперационном периоде нарушений гемостаза не отмечали. Повышение уровня антитромбина III отметили у одного ребенка с цианотичным ВПС (рисунк 4, пациент № 9); течение периоперационного периода – без особенностей.

У 11 (45,8%) детей с ВПС (цианотичными и нецианотичными) было отмечено значительное превышение концентрации D-димера (рисунк 5).

Рисунок 2

Концентрация протромбина по Квику у детей с ВПС в первые 12 часов жизни

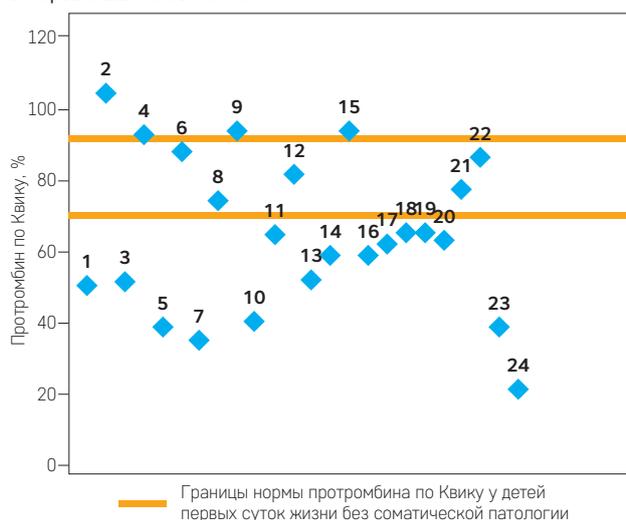


Рисунок 3

АЧТВ у детей с ВПС в первые 12 часов жизни

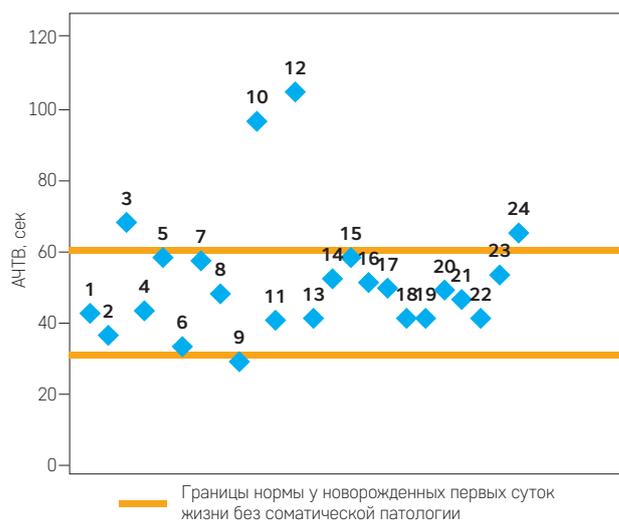


Рисунок 4

Концентрация антитромбина III у детей с ВПС в первые 12 часов жизни



Рисунок 5

Концентрация D-димера у детей с ВПС в первые 12 часов жизни

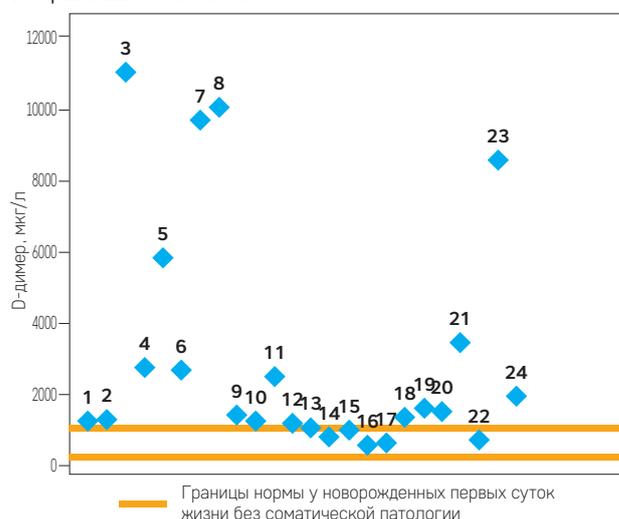
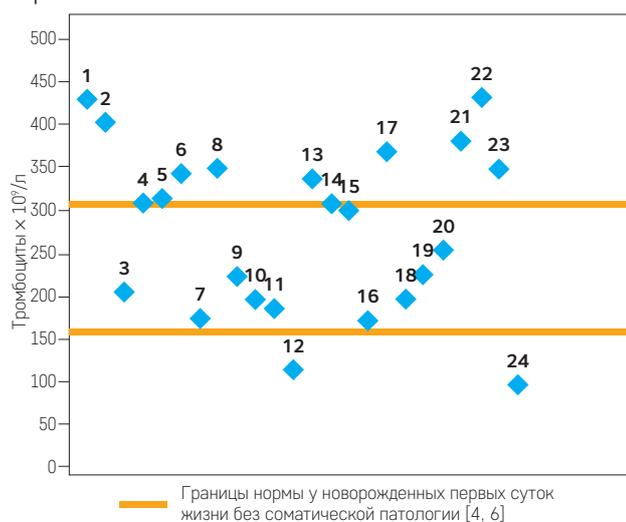


Рисунок 6

Уровень тромбоцитов периферической крови у детей с ВПС в первые 12 часов жизни



У 9 новорожденных исследуемой группы уровень тромбоцитов был повышен; а у 2 детей был ниже нормативных показателей для данного возраста [4, 5] (рисунок 6). Структура ВПС у детей с уровнем тромбоцитов, выходящим за пределы нормативных значений, в равной степени представлена цианотичными и нецианотичными критическими пороками сердца. Такие отклонения от нормы не сопровождались нарушениями гемостаза.

Оперативное лечение в неонатальном периоде было проведено 13 из 24 детей. У одного ребенка с цианотичной формой ВПС (транспозиция магистральных сосудов) после оперативного вмешательства – процедуры Рашкинда – течение раннего послеоперационного периода осложнилось обтурирующим тромбозом правой подвздошной и нижней полых вен с клиническими проявлениями в виде цианоза, отека правой нижней конечности. Проведена антикоагулянтная терапия под контролем эффективности назначенной лечебной дозы препарата. Через 2 недели от начала антикоагулянтной терапии получена полная реканализация сосудов. Общий курс антикоагулянтной терапии составил 6 недель. На 21-е сутки после процедуры Рашкинда ребенку выполнили операцию: наложение модифицированного подключично-легочного анастомоза по Blalock слева с синтетическим протезом из PTFE; перевязка открытого артериального протока; суживание легочной артерии. Нарушений со стороны гемостаза впоследствии не было; анастомоз функционирует, проходим.

В первые 12 ч жизни, по результатам лабораторного обследования, показатели D-димера, антитромбина III, АЧТВ, фибриногена у этого пациента были в пределах нормативных значений; уровень тромбоцитов несколько повышен – до $431 \times 10^9/\text{л}$; протромбин по Квику – ниже нормы – 50,3% (рисунки 1–6,

пациент № 1). Отметим, что состояние при рождении у данного ребенка было тяжелым, потребовалось проведение первичных реанимационных мероприятий, перевод на ИВЛ, была выполнена постановка центрального венозного катетера, проведена длительная терапия миорелаксирующими препаратами. Течение раннего неонатального периода осложнялось также реализацией гемолитической болезни новорожденного по АВО-системе (анемичная форма, тяжелое течение); инфекцией перинатального периода. Сочетание таких факторов риска способствовало развитию у ребенка тяжелого тромботического осложнения в послеоперационном периоде [15–17].

У остальных новорожденных в послеоперационном периоде нарушений гемостаза не выявили.

ВЫВОДЫ

По результатам проведенного исследования у детей в первые 12 часов жизни выявленные лабораторные нарушения в виде снижения уровня протромбина по Квику (у 15 из 24 пациентов), фибриногена (у 3 пациентов), антитромбина III (у 5 пациентов) не были ассоциированы с типом ВПС (цианотичным или нецианотичным пороком) и не сопровождались клинически геморрагическими и тромботическими осложнениями. Удлинение АЧТВ более 90 сек в первые 12 часов жизни у 2 детей сопровождалось гипоксически-геморрагическим поражением ЦНС, однако после оперативного лечения по поводу ВПС геморрагических осложнений не отмечено. У большинства новорожденных с ВПС (у 11 из 24) показатель концентрации D-димера был значительно повышен, поэтому не может быть использован для оценки гемостаза у этой категории пациентов. При планировании анестезиологического обеспечения детям с ВПС следует учитывать, что удлинение АЧТВ в первые 12 часов жизни может свидетельствовать об имеющемся гипоксически-геморрагическом поражении ЦНС, а повышение концентрации D-димера не является достоверным маркером имеющихся или потенциальных геморрагических или тромботических осложнений.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Shumakova O.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3627-077X>

Morozova N.Ya. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7159-805X>

Burov A.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7374-9803>

Podurovskaya Yu.L. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9928-6234>

Degtyarev D.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8975-2425>

Литература

1. Катарбаев А.К. Структура причин младенческой и детской смертности. Медицинская картотека 2003; 6 (69): 29–31.
2. Сорокина З.Х. Сравнительная оценка заболеваемости и ранней неонатальной смертности в субъектах РФ для научного обоснования модели оптимизации помощи новорожденным. Акушерство и гинекология 2010; 6: 102–8.
3. Mathews T.J. Infant Mortality Statistics From the 2007 Period. National Vital Statistics Reports 2011; 59 (6): 31 с.
4. Шабалов Н.П. Неонатология: учеб. пособие. в 2 тт. Изд 3-е., испр. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2004; т. 2.
5. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. – М.: ООО Издательство «Триада», 2005.
6. Козлова Е.Л., Климович Н.Н. Особенности функционирования системы гемостаза в ранний неонатальный период. Проблемы здоровья и экологии 2011; 13–9.
7. Шарыкин А.С. Врожденные пороки сердца. Руководство для педиатров, кардиологов, неонатологов. Изд 2-е. – М.: БИНОМ, 2009.
8. Anderson R.H., Baker E.J., Penny D., Redington A.N., Rigby M.L., Wernovsky G. Paediatric Cardiology, 3rd Edition, Copyright 2010 by Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Ltd. 1329.
9. Детская кардиохирургия: Руководство для врачей. Под ред. Л.А. Бокерия, К.В. Шаталова. – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева, 2016.
10. Бокерия Л.А. Лекции по сердечно-сосудистой хирургии. – М.: Издательство НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2005.
11. Котова А.Н. Система гемостаза и особенности антитромботической терапии у детей первого года жизни с «цианотическими» врожденными пороками сердца / Дисс. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук. – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева, 2011.
12. Society of Thoracic Surgeons National Congenital Heart Surgery Database Committee. Proceedings of the International Nomenclature and Database conference for Pediatric Cardiac Surgery, 1998-1999. Ann Torac Surg 2000; 69: 1–372.
13. Антович Й., Бломбек М. Нарушение свертывания крови. Практич. рекомендации по диагностике и лечению (Пер. с англ.). – М.: Мед. лит., 2014.
14. Gardner S.L., Carter B.S., M. Enzman Hines et al. Neonatal Intensive Care. U.S.A.: ELSEVER, 2015.
15. Морозова Н.Я., Буров А.А., Подуровская Ю.Л., Филиппова Е.А., Ушакова Л.В., Пыков М.И. и др. Актуальность ранней ультразвуковой диагностики у новорожденных с пренатальными и хирургическими факторами риска развития тромботических осложнений. Акушерство и гинекология 2017; 6: 111–6.
16. Boulet S.L., Grosse S.D., Thornburg C.D., Yusuf H., Tsai J., Hooper W.C. Trends in venous thromboembolism-related hospitalisations, 1994–2009. Pediatrics 2012; 130 (4): 812–20.
17. Branchford B.R., Mourani P., Bajaj L., Manco-Jonson M., Wang M., Goldenberg N.A. Risk factors for in-hospital venous thromboembolism in children: a case-control study employing diagnostic validation. Haematologica 2012; 97 (4): 509–15.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-35-40

Имунофенотипическая характеристика острого мегакариобластного лейкоза у детей

М.Ю. Алексенко¹, О.И. Илларионова¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Е.А. Зеркаленкова¹,
И.А. Новикова⁴, А.В. Панферова¹, Л.Г. Фечина^{2,3}, Г.А. Цаур^{2,3},
Ю.В. Ольшанская¹, А.М. Попов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург

³ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

⁴ ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Острый мегакариобластный лейкоз (ОМКЛ) – разновидность острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), в основе которого лежит избыточная пролиферация мегакариобластов в костном мозге. ОМКЛ – редкий вариант ОМЛ как среди детей, так и среди взрослых, но характеризуется высокой частотой среди пациентов с синдромом Дауна. Морфологическая диагностика ОМКЛ сопряжена с рядом трудностей, поэтому ключевую роль в диагностике играет иммунофенотипирование. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Цель исследования – комплексная оценка иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с ОМКЛ. Исследуемую группу составили 103 образца костного мозга детей с ОМКЛ. Иммунофенотипирование проводили методом проточной цитометрии. По результатам исследования выявлено три группы пациентов с разным уровнем экспрессии CD45, при этом большинство пациентов (74%) имело высокую экспрессию данного маркера. При комплексной оценке фенотипа выявлен ряд других достоверных отличий между этими группами. У 56% больных ОМКЛ была обнаружена трисомия 21 хромосомы в костном мозге, при этом именно дети с трисомией составили большинство в группе пациентов с высокой экспрессией CD45 (64% в группе и 86% всех пациентов с трисомией). Кроме того, выявлен ряд достоверных фенотипических отличий у пациентов с трисомией и без нее в рамках группы с высокой экспрессией CD45. Данное исследование продемонстрировало существенную иммунофенотипическую гетерогенность ОМКЛ. В целом выявленное разнообразие, очевидно, отражает биологическую неоднородность данной группы пациентов с ОМЛ.

Ключевые слова: острый мегакариобластный лейкоз, ОМКЛ, ОМЛ, трисомия 21, CD45, дети, иммунофенотипирование, проточная цитометрия

Алексенко М.Ю. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 35–40.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-35-40

Immunophenotypic characterization of acute megakaryoblastic leukaemia in children

M.Yu. Alexenko¹, O.I. Illarionova¹, T.Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, E.A. Zerkalnikova¹, I.A. Novikova⁴, A.V. Panferova¹,
L.G. Fechina^{2,3}, G.A. Tsaur^{2,3}, Yu.V. Olshanskaya¹, A.M. Popov¹

¹ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

² Regional Children Clinical Hospital № 1, Ekaterinburg

³ Research Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg

⁴ Rostov Institute of Oncology, Rostov-on-Don

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) is a rare subtype of acute myeloid leukemia, in which the bone marrow produce increased numbers of immature abnormal megakaryoblasts. AMKL is rare both in children and adults, but is the most frequent subtype of acute myeloid leukemia (AML) in children with Down syndrome. Morphological diagnosis of this disease could be complicated, thus flow cytometry plays a crucial role in the diagnostics of AMKL. The aim of the present study was to investigate the immunophenotypic characteristics of AMKL in children. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The study group included 103 patients with AMKL. Antigen expression profile was assessed by multicolor flow cytometry. We identified three groups of patients according to different levels of CD45 expression, and in majority of patients (74%) high level of CD45 expression was detected. Significant immunophenotypic differences between these groups were found. In 56% of patients trisomy of 21 chromosome was detected. Among these patients, 86% belonged to group of high CD45 expression. Moreover, children with trisomy 21 represented the majority in the group with high level of CD45 expression (64%). Also, there were found several significant differences between patients with and without trisomy 21 within the group of high CD45 expression. This study demonstrated the wide immunophenotypic heterogeneity of AMKL. In general, the revealed diversity obviously reflects the biological heterogeneity of this AML subtype.

Key words: acute megakaryoblastic leukaemia, AMKL, AML, trisomy 21, CD45, children, flow cytometry

Alexenko M.Yu., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 35–40.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-35-40

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 07.05.2019

Принята к печати 10.06.2019

Контактная информация:

Попов Александр Михайлович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией иммунофенотипирования гемобластозов НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1.
E-mail: uralcytometry@gmail.com

© 2019 by NMRC PHOI

Received 07.05.2019

Accepted 10.06.2019

Correspondence:

Alexander M. Popov, MD, PhD, Head of Hemoblastosis immunophenotyping laboratory of the Department of pediatric oncological surgery Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: uralcytometry@gmail.com

Острый мегакариобластный лейкоз (ОМКЛ) – вид острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), для которого характерна избыточная пролиферация мегакариобластов в костном мозге. Это один из самых редких видов ОМЛ, на его долю приходится около 4–15% всех детских ОМЛ и около 1% всех ОМЛ у взрослых [1].

В соответствии с классификацией ВОЗ данное заболевание принято разделять на три группы: ОМКЛ с транслокацией t(1;22)(p13;q13); ОМКЛ, ассоциированный с синдромом Дауна (СД-ОМКЛ), и ОМКЛ без детальной спецификации, к которому относятся все остальные случаи данного заболевания [2].

Пациенты с синдромом Дауна в целом имеют более высокий риск развития острых лейкозов, однако чаще всего у них развивается именно ОМКЛ [3]. У 20–30% пациентов с синдромом Дауна развитию ОМКЛ предшествует такое состояние, как транзиторный аномальный миелопоэз (ТАМ) [4]. Данное заболевание характеризуется присутствием в периферической крови клональной популяции мегакариобластов, протекает бессимптомно и в большинстве случаев разрешается без какого-либо лечения. Примерно в 20% случаев ТАМ трансформируется в ОМКЛ [1]. В классификации ВОЗ ТАМ и СД-ОМКЛ объединены в единую группу миелоидных пролифераций, связанных с синдромом Дауна [2].

Морфологическая диагностика ОМКЛ – как правило, непростая задача, поэтому для постановки диагноза особенно важно проведение иммунофенотипирования. В соответствии с данными ВОЗ главный признак мегакариоцитарной природы опухолевых клеток – экспрессия одного или нескольких тромбоцитарных гликопротеинов: CD41, CD61, CD42b. Кроме того, для большинства случаев ОМКЛ характерна экспрессия миелоидных маркеров CD13, CD33 и маркера CD36. Маркеры HLA-DR и CD34, как правило, отрицательны. Гранулоцитарные и лимфоидные маркеры также отрицательны, однако достаточно часто встречается aberrантная экспрессия CD7 [2].

Отдельного внимания заслуживает маркер CD45, который, по данным различных исследовательских групп, обычно не экспрессируется при ОМКЛ, ассоциированном с t(1;22), и ОМКЛ без детальной спецификации [2, 5]. Информация касательно экспрессии данного маркера при ТАМ и СД-ОМКЛ в классификации ВОЗ 2017 года не отражена, однако есть публикации, в соответствии с которыми бластные клетки при ТАМ и СД-ОМКЛ CD45-положительны. Так, по данным N.J. Karandikar и соавт. (2001), CD45 выявляют в подавляющем большинстве случаев ТАМ и СД-ОМКЛ [6].

Цель исследования: комплексная оценка иммунофенотипа опухолевых клеток у детей с ОМКЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имунофенотипирование проведено в Лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России и в Лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ОДКБ № 1 г. Екатеринбурга в период с 2006 по 2018 год. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НИИЦ ДГОИ.

Исследование первичного иммунофенотипа провели у 103 пациентов (62 мальчиков и 41 девочки); медиана возраста составила 1 год 4 мес. (от 2 мес. до 13 лет). Диагноз ОМКЛ был поставлен на основании данных морфологического, цитохимического исследований и иммунофенотипирования костного мозга. Иммунофенотипирование производили методом 4–8-цветной проточной цитометрии на приборах *FACS Canto* и *FACS Canto II* (Becton & Dickinson, США). Для определения экспрессии исследуемых маркеров использовали моноклональные антитела, меченные различными флуорохромами (таблица 1). Окрашивание антителами производили согласно инструкции производителя.

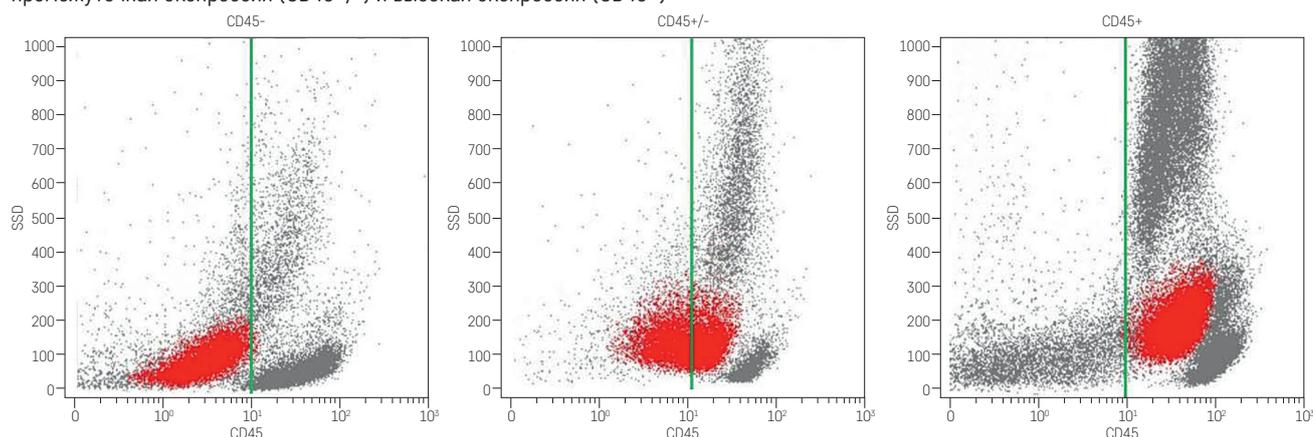
Таблица 1
Моноклональные антитела и флуорохромы

Флуорохром	Моноклональные антитела
PE	CD10, CD7, CD34, CD1a, CD45, CD22, CD133, CD13, CD8, CD58, CD20, CD79a, TdT, CD38, CD11a, CD11b, CD11c, CD2, CD235a, CD99, MPO
FITC	CD61, CD58, CD45, CD99, CD7, CD7, CD65, CD15, CD10, CD19, CD4, CD3, MPO, CD64, CD66b, CD5, CD71
PerCP	CD19, CD20, CD8, CD45, CD34
PerCP-Cy5.5	CD20, CD38, CD19, CD79a, CD5
PE-Cy7	CD34, CD3, CD56, CD10, CD38, CD22, CD33
APC-Cy7	CD45, CD20, CD14, CD3, CD4
APC	CD41, CD19, CD117, CD3, CD133, CD56, CD79a, CD79a, CD10, CD11c, CD38, CD41a, TdT, IgM, CD33
BV421	CD2, CD13, CD33
BV510	CD15, CD11c, CD3, CD15, CD38, CD10

Результаты иммунофенотипирования оценивали при помощи программного обеспечения *FACS Diva 4.0-6.1* (Becton & Dickinson, США) и *Kaluza v2.1* (Beckman Coulter, США). Популяцию бластных клеток выделяли на точечных графиках исходя из экспрессии CD45 и значений параметров бокового светорассеяния (SSC).

Рисунок 1

Различные типы экспрессии маркера CD45 при ОМКЛ у детей: экспрессия CD45 отсутствует (CD45-); промежуточная экспрессия (CD45+/-) и высокая экспрессия (CD45+)



Экспрессию антигенов оценивали по критериям Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias – EGIL*), в соответствии с которыми бластная популяция рассматривается как положительная, если процент позитивных клеток для внутриклеточных и мембранных маркеров выше 20 и 10% соответственно [7].

Стандартное кариотипирование выполнено методом G-дифференциального окрашивания и проведено у 93 из 103 пациентов. Запись кариотипа осуществлялась в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature – ISCN, 2009*) [8]. Среди этих 93 пациентов у 40 (43,0%) была выявлена конституциональная трисомия 21 (синдром Дауна). Еще в 12 случаях данная aberrация была соматической (выявлялась только в опухолевых клетках).

Достоверность отличий по количеству позитивных пациентов определяли с помощью критерия χ^2 . Количественные отличия с учетом процента экспрессирующих клеток оценивали с применением непараметрического критерия Манна–Уитни. Оценку отличий по частоте трисомии 21 хромосомы в различных группах пациентов также проводили с применением критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с данными ВОЗ в большинстве подтипов ОМКЛ, как правило, отсутствует экспрессия антигена CD45 [2]. Однако, по данным проведенного нами исследования, высокая экспрессия данного маркера была отмечена у подавляющего большинства пациентов. В зависимости от степени экспрессии этого антигена [9] мы выделили три группы (рисунок 1):

- CD45-отрицательные пациенты (группа CD45-);

- пациенты с промежуточной экспрессией CD45 (группа CD45+/-);
- пациенты с высокой экспрессией CD45 (группа CD45+).

Большинство пациентов – 76 (74%) человек – имело высокую экспрессию CD45; низкая экспрессия CD45 отмечена у 19 (18%); промежуточная (частичная) – у 8 (8%) пациентов. В качестве порогового значения для определения на точечных графиках уровня экспрессии CD45 использовали левую границу популяции нейтрофилов (рисунок 1) [9]. На следующем этапе проведено сравнение фенотипа в группах с низкой и высокой экспрессией CD45 (группы CD45- и CD45+ соответственно). При сравнении экспрессии различных маркеров в этих группах обнаружено, что процент пациентов, положительных по антигенам CD56, CD7, CD61 и CD2, в этих группах достоверно отличается (таблица 2). Так, например, экспрессия CD56 была положительной у 71% пациентов в группе CD45- и лишь у 22% в группе CD45+.

Таблица 2

Доля позитивных пациентов в группах CD45- и CD45+

Маркер	Доля позитивных пациентов, %		p
	группа CD45-	группа CD45+	
CD56	71	22	< 0,001
CD7	42	81	< 0,001
CD61	100	78	0,023
CD2	7	36	0,035
CD13	33	49	0,240
CD117	89	80	0,381
CD11a	0	5	0,437
CD34	53	61	0,490
CD41a	88	81	0,549
CD33	89	89	0,986

При количественном анализе процентного содержания клеток, экспрессирующих каждый конкретный антиген, в этих же группах были выявлены достоверные отличия в экспрессии маркеров CD41, CD61, CD56, CD2, CD7 и CD13 (рисунк 2). Отдельно стоит отметить маркеры CD41 и CD13, так как доля пациентов, позитивных по данным маркерам в группах CD45- и CD45+, не имела существенных отличий (таблица 2). Тем не менее при количественном анализе было выявлено, что экспрессия маркера CD41 в группе CD45+ достоверно ниже, а маркера CD13 – достоверно выше по сравнению с группой CD45- (рисунк 2). Группа пациентов с промежуточной (частичной) экспрессией CD45 в целом сочетала в себе черты как группы CD45-, так и группы CD45+, отличаясь от них лишь экспрессией маркеров CD61 и CD7 (рисунк 3).

Данные цитогенетического исследования были доступны для 93 из 103 пациентов. У 52 (56%) пациентов выявлена трисомия 21 хромосомы (изолированно либо в составе комплексного кариотипа). Среди пациентов с трисомией 21 большинство ($n = 45$; 86%) имели высокую экспрессию CD45; промежуточная экспрессия CD45 отмечена у 2 (4%), а отсутствие экспрессии CD45 – у 5 (10%) пациентов с данной аномалией. Кроме того, доля пациентов с трисомией 21 хромосомы в группе CD45+ составила 64%, а в группах CD45+/- и CD45- – 29 и 31% соответственно (рисунк 4). Достоверные отличия по частоте трисомии 21 были выявлены только между группами CD45+ и CD45- ($p = 0,016$).

Доля пациентов с конституциональной трисомией 21 в группах CD45-, CD45+/- и CD45+ составила 6; 14 и 57% от общего количества пациентов соответственно.

При сравнении фенотипа у пациентов с трисомией 21 и без нее внутри группы CD45+ было выявлено, что экспрессия маркеров CD41, CD61 и CD2 у пациентов с трисомией 21 достоверно ниже, а маркеров CD7, CD13 и CD33 – достоверно выше, чем у пациентов без данного генетического нарушения (рисунк 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Систематизированных данных по иммунофенотипу опухолевых клеток при ОМКЛ нет. Ключевыми отличиями данного варианта от других типов ОМЛ, по результатам большинства исследований, считается экспрессия (мембранная и внутриклеточная) тромбоцитарных гликопротеинов CD41 и CD61 [5, 7], отсутствие CD11a [10] и CD45 [2, 5]. В соответствии с классификацией ВОЗ экспрессия CD45, как правило, не характерна для таких типов ОМКЛ, как ОМКЛ с $t(1;22)$ и ОМКЛ без детальной спецификации. Применительно к ТАМ и СД-ОМКЛ экспрессия CD45 в классификации ВОЗ не охарактеризована, однако

Рисунок 2

Сравнение фенотипа в группах CD45- и CD45+

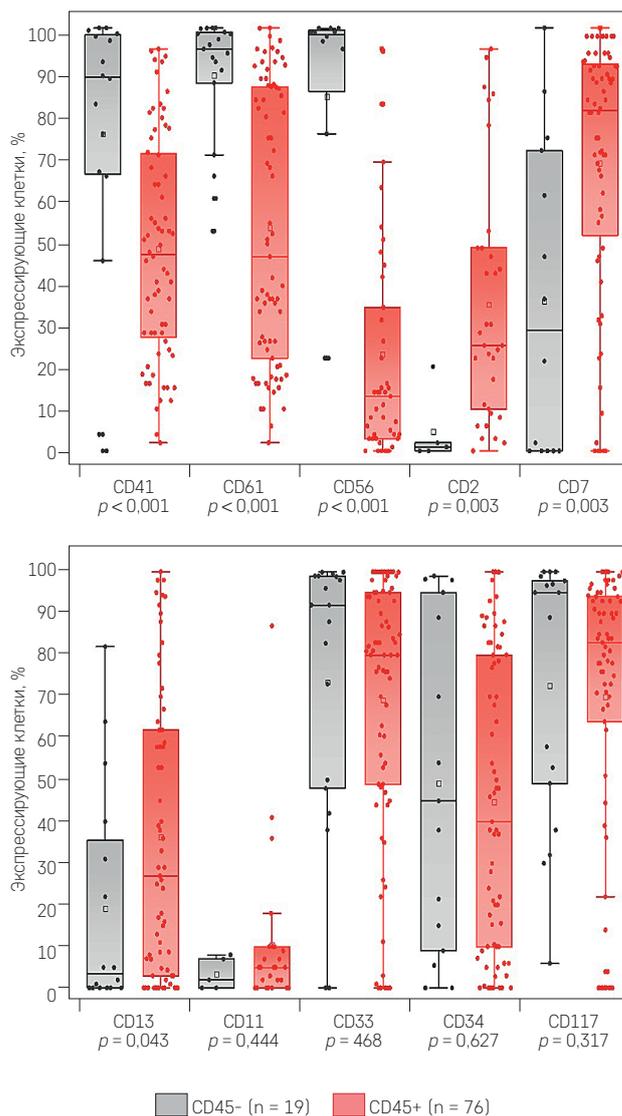


Рисунок 3

Отличия экспрессии CD61 и CD7 в группе CD45+/- (зеленый цвет) по сравнению с группами CD45- (слева) и CD45+ (справа)

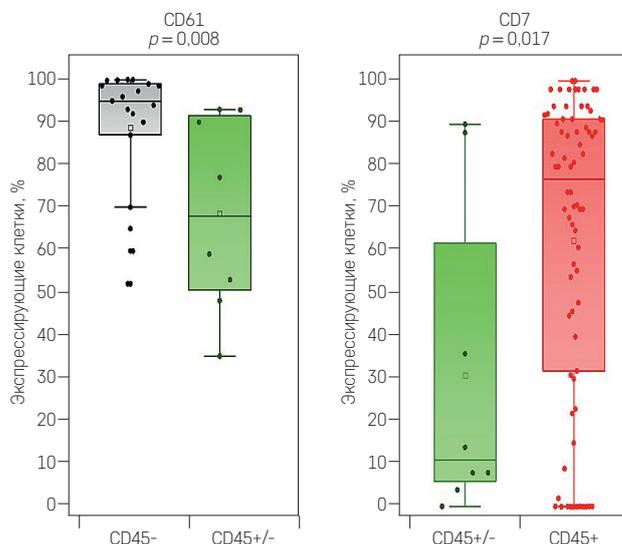
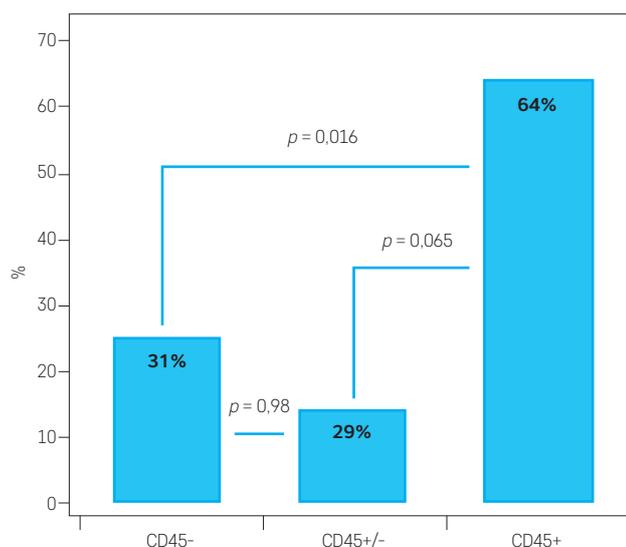
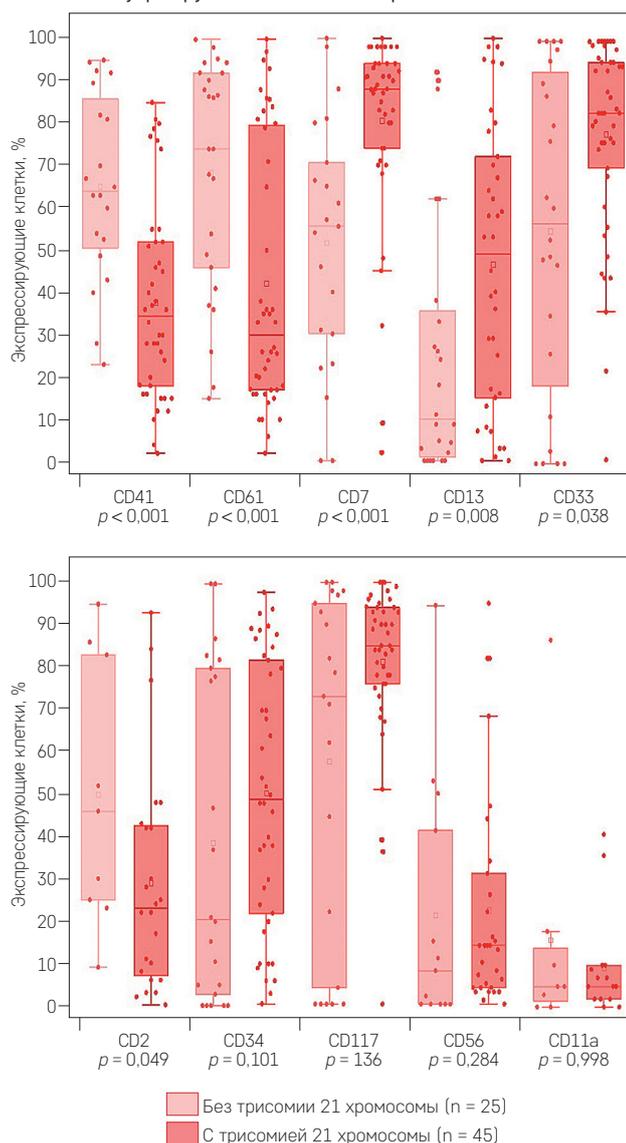


Рисунок 4

Частота трисомии 21 хромосомы в группах с различной экспрессией CD45

**Рисунок 5**

Сравнение фенотипа пациентов с трисомией 21 хромосомы и без нее внутри группы с высокой экспрессией CD45+



есть литературные источники, в которых описана CD45-позитивность для данной группы ОМКЛ [6].

Мы предприняли попытку комплексно оценить антигенный профиль blasts при ОМКЛ на достаточно большой выборке пациентов ($n = 103$). Результаты нашего исследования отличаются от опубликованных ранее данных. Основное отличие состоит в том, что большинство пациентов имело высокую экспрессию CD45 (74%). Частота обнаружения трисомии 21 была существенно выше у пациентов с высокой экспрессией CD45, по сравнению с группой CD45-. Полученные данные в целом соответствуют данным литературы об экспрессии CD45 при миелоидных пролиферациях, связанных с синдромом Дауна [6]. Тем не менее в группу CD45+ входили не только пациенты с трисомией 21, но и существенное количество детей (36%) без данной генетической аномалии. В то же время каждый 10-й пациент с трисомией 21 был CD45-негативным, а еще 4% детей имели гетерогенную экспрессию данного маркера.

При анализе данных пациентов с высокой экспрессией CD45 выявлены некоторые особенности их фенотипа. Наиболее достоверные отличия обнаружены в отношении мегакариоцитарных маркеров CD61, CD41 и маркера CD56, экспрессия которых в группе CD45+ оказалась достоверно ниже, чем в группе CD45-. В группе CD45+ отмечена также более высокая экспрессия CD7, CD2 и CD13.

При сравнении фенотипа пациентов с трисомией 21 и без нее внутри группы CD45+ у пациентов с трисомией 21 обнаружена более низкая экспрессия мегакариоцитарных маркеров CD61, CD41 и маркера CD2, а также более высокий процент экспрессии CD7, CD13 и CD33.

Отдельно стоит отметить небольшую группу пациентов ($n = 8$) с промежуточной экспрессией CD45, фенотип которой сочетал в себе черты групп CD45- и CD45+, отличаясь от них лишь экспрессией маркеров CD61 и CD7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованная группа пациентов с ОМКЛ продемонстрировала существенную иммунофенотипическую гетерогенность. Большинство обследованных больных имели высокую экспрессию CD45. Было выявлено, что пациенты с различным уровнем экспрессии CD45 имеют достоверные отличия по антигенному профилю опухолевых клеток. При этом, как и ожидалось, большинство в группе CD45+ составили дети с трисомией 21. Их иммунофенотип имел некоторые отличия даже по сравнению с другими CD45-позитивными случаями. В целом выявленное разнообразие антигенного профиля при ОМКЛ, очевидно, отражает биологическую неоднородность данной группы ОМКЛ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Alexenko M.Yu.: <https://orcid.org/0000-0002-2521-5353>

Alexenko M.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2521-5353>

Illarionova O.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2685-674X>

Verzhbitskaya T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>

Zerkalenkova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9634-5828>

Novikova I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6689-5861>

Panferova A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8580-3499>

Fechina L.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1885-3912>

Tsaur G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>

Olshanskaya Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>

Popov A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Литература

1. Gruber T.A., Downing J.R. The biology of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Blood* 2016; 126 (8): 943–9.
2. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
3. Mejía-Aranguré J. M. (ed.). Etiology of Acute Leukemias in Children. Springer International Publishing Switzerland; 2016.
4. Roy A., Roberts I., Norton A., Vyas P. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome: a multi-step model of myeloid leukemogenesis. *Br J Haematol* 2009; 147 (1): 3–12.
5. Илларионова О.И., Горчакова М.В., Русанова Е.Б., Прохорова Ю.А., Салогуб Г.Н., Осипова Е.Ю. и соавт. Конспект клинической цитометрии: острый мегакариобластный лейкоз. *Клиническая лабораторная диагностика* 2015; 60 (7): 42–9.
6. Karandikar N.J., Aquino D.B., McKenna R.W., Kroft S.H. Transient myeloproliferative disorder and acute myeloid leukemia in Down syndrome. An immunophenotypic analysis. *Am J Clin Pathol* 2001 Aug; 116 (2): 204–10.
7. Bene M., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9 (10): 1783–6.
8. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 298 (7731): 971–2.
9. Новикова И.А., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Цаур Г.А., Белевцев М.В., Попов А.М. Стандарт российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей. *Онкогематология* 2018; 13 (1): 73–82.
10. Boztug H., Schumich A., Pötschger U., Mühlegger N., Kolenova A., Reinhardt K., et al. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2013; 84B: 370–8.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-41-45

Синдром Фишера–Эванса у детей: анализ генных нарушений и ответа на терапию

Ж.А. Кузьмина, Е.Д. Пашанов, А.В. Павлова, М.А. Курникова, И.В. Мерсиянова,
С.А. Плясунова, Н.С. Сметанина

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Синдром Фишера–Эванса (СФЭ) – двух-/трехростковая иммунная гемопатия в отсутствие других заболеваний. СФЭ может быть первичным/идиопатическим и вторичным, на фоне других заболеваний. У детей СФЭ нередко связан с первичным иммунодефицитным состоянием (ПИДС). В статье представлен ретроспективный анализ данных группы детей (n = 14) с СФЭ, обратившихся в НМИЦ ДГОИ в период 2012–2019 гг., с целью демонстрации необходимости проведения молекулярно-генетического исследования для диагностики ПИДС. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Всем пациентам было проведено исследование методом секвенирования следующего поколения (NGS). Медиана возраста дебюта заболевания составила 5,5 года (от 5 мес. до 16 лет). Соотношение по полу (мальчики:девочки) – 1,8:1. По результатам генетического обследования у 10 (71,4%) из 14 пациентов СФЭ оказался вторичным. Медиана возраста дебюта заболевания у пациентов с вторичным СФЭ – 4 года; минимальный возраст – 5 мес.; максимальный – 12 лет. Распределение по полу (мальчики:девочки) – 7:3. Чаще встречался дебют заболевания, ассоциированный с ИТП (35,7% больных) или одновременно с ИТП и АИГА (35,7% пациентов); реже начало заболевания было связано с АИГА с последующим присоединением ИТП (21,4% детей). Трехростковая иммунная цитопения отмечена у 1 пациента с СФЭ, ассоциированным с ПИДС. Среди наших пациентов с дебютом заболевания, ассоциированным с АИГА, ни в одном случае не было выявлено ПИДС. Отмечена крайне низкая эффективность ГКС и ВВИГ при СФЭ: практически в 100% случаев пациентам анализируемой группы требовалось назначение второй и последующих линий терапии. Среди других видов терапии, эффективных как при первичном, так и при вторичном СФЭ, следует отметить ритуксимаб (62% пациентов сохраняют ремиссию до 1 года) и ММФ (80% пациентов сохраняют ремиссию до 1 года). На основании проведенного исследования можно сделать вывод, что у пациентов с СФЭ мужского пола до 18 лет, которые дебютировали с ИТП, необходим тщательный поиск ПИДС с включением генетического анализа, так как у больных этой группы, наиболее высокая частота встречаемости ПИДС. Лечение СФЭ ГКС и ВВИГ практически всегда малоэффективно, требуется назначение второй и последующих линий терапии. Препараты выбора, имеющие наибольшую эффективность среди пациентов с СФЭ, – ритуксимаб и ММФ.

Ключевые слова: синдром Фишера Эванса, аутоиммунная цитопения, дети, диагностика, лечение

Кузьмина Ж.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 41–45.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-41-45

Fisher–Evans Syndrome in Children: an Analysis of Genetic Defects and Therapy Response

Z.A. Kuzminova, E.D. Pashanov, A.V. Pavlova, M.A. Kurnikova, I.V. Mersiyanova, S.A. Plyasunova, N.S. Smetanina

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

The Fisher–Evans syndrome (FES), also known as Evans syndrome (ES) is an immune hemopathy characterized by bicytopenia or pancytopenia in the absence of other diseases. FES may be either primary/idiopathic, or secondary, occurring against the background of other diseases. In children, FES is frequently related to a primary immunodeficiency disorder (PID). This article presents a retrospective data analysis of a cohort of pediatric patients (n = 14) with FES, the aim of which is to demonstrate the necessity of conducting a molecular genetic investigation for PID diagnosis. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The patients from this cohort were presented at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology during the period 2012–2019. All of these patients underwent Next Generation Sequencing (NGS). The median age of disease onset was 5.5 years (from 5 months to 16 years). The male-to-female ratio was 1.8:1. Thanks to the results of the genetic investigation conducted on 14 patients with FES, it was possible to identify 10 children (71.4%) who had secondary FES. The median age of disease onset in patients with secondary FES was 4 years, the minimum age was 5 months, the maximum age was 12 years. The male-to-female ratio was 7:3. Most frequently, the disease onset was associated with ITP, immune thrombocytopenia (35.7% of patients) or simultaneously with ITP and AIHA, autoimmune hemolytic anemia (35.7% of patients); less frequently, the disease onset was associated with AIHA, with a subsequent occurrence of ITP (21.4% of patients). A pancytopenia was identified in 1 patient with FES associated with a PID. Among our patients with a disease onset associated

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 21.03.2019

Принята к печати 10.06.2019

Контактная информация:

Кузьмина Жанна Андреевна, гематолог, научный сотрудник отдела оптимизации лечения гематологических заболеваний Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: zfokina@yandex.ru

© 2019 by NMRC PHOI

Received 21.03.2019

Accepted 10.06.2019

Correspondence:

Jeanne A. Kuzminova, hematologist, scientist of the Department of Hematology and cell technology Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: zfokina@yandex.ru

with AIHA, there was not a single case with a PID. We noted an extremely low effectiveness of glucocorticoids and IVIGs for the treatment of FES: in practically 100% of cases, the patients in the analysed group required second and subsequent lines of therapy. Among other therapy types, effective for both primary and secondary FES, we should note rituximab (62% of patients stay in remission for up to 1 year) and MMF (80% of patients stay in remission for up to 1 year). On the basis of the conducted study we can conclude that male patients with FES under 18 years of age whose disease onset was associated with ITP need to be thoroughly tested for PID, including genetic testing, since patients in this group have the greatest PID incidence. Treating FES with glucocorticoids and IVIGs is nearly always not very effective and second and subsequent lines of therapy are required.

The drugs of choice which are most effective for patients with FES are rituximab and MMF.

Key words: *Evans syndrome, autoimmune cytopenias, children, diagnosis, treatment*

Kuzminova Z.A., et al. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*, 2019; 18 (3): 41–45.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-41-45

Синдром Фишера–Эванса (СФЭ) – редкое заболевание, которое первоначально было охарактеризовано как наличие аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) и иммунной тромбоцитопении (ИТП) неизвестной этиологии (*R.S. Evans и соавт.*, 1951). Со временем определение этого заболевания менялось, и сегодня СФЭ диагностируют при наличии поражения по меньшей мере двух линий клеток крови в случае отсутствия других заболеваний [1].

Точных данных о заболеваемости СФЭ среди детей нет. Самое большое доступное педиатрическое исследование проведено во Франции *N. Aladjidi и соавт.* и включало 156 детей с СФЭ. Медиана возраста развития цитопении составила 5,4 года (от 0,2 до 17,2 года); в группе пациентов младшего возраста преобладали мальчики, в старшей возрастной группе – девочки [2]. Смертность среди детей составила 7–10% [2, 3].

СФЭ может быть как первичным/идиопатическим, так и вторичным, на фоне других заболеваний. Первичный СФЭ является диагнозом исключения, в этом случае необходим тщательный поиск основного заболевания, так как эффективность проводимой терапии значительно отличается при первичном и вторичном СФЭ.

Развитие СФЭ у детей может быть начальным проявлением первичного иммунодефицитного состояния (ПИДС) [4]. У детей с иммунными цитопениями необходимо исключить такие заболевания, как системная красная волчанка (СКВ), общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), гемофагоцитарные заболевания. Перечень дифференциальных диагнозов расширяется, к нему добавлены *MonoMac* синдром (GATA2 дефицит), дефицит CD27, LRBA-синдром, синдром активированной PI3KD (АПДС), X-сцепленный иммунодефицит с дефектом магния (дефицит MAGT1) и др. [4].

У взрослых и детей СФЭ имеет отличия. В исследовании *M. Michel и соавт.* у 68 взрослых пациентов с СФЭ не было выявлено ни одного ПИДС, однако 8 случаев СФЭ были связаны с развитием злока-

чественного заболевания [5]. Напротив, в педиатрическом исследовании *N. Aladjidi и соавт.* у 3 из 156 детей идентифицировали ПИДС, но ни в одном случае он не был связан со злокачественными новообразованиями [2].

СФЭ имеет хроническое, рецидивирующее течение; статус заболевания и состояние пациентов зачастую зависят от длительного приема иммуносупрессивных препаратов [2, 6]. Терапия СФЭ у детей – сложная задача из-за отсутствия научно обоснованных данных. Препаратами выбора первой линии остаются глюкокортикостероиды (ГКС) – в монотерапии или в комбинации с внутривенным иммуноглобулином (ВВИГ), однако эффективность данной терапии невысока, около 69% пациентов требуют назначения второй и последующих линий терапии [2, 6]. В качестве второй линии терапии при рефрактерном и рецидивирующем течении изначально применяли спленэктомию, но сегодня ее вытеснила терапия ритуксимабом [6].

В статье представлен результат анализа данных небольшой группы пациентов в возрасте до 18 лет с СФЭ. Цель анализа – показать необходимость проведения диагностического поиска иммунодефицитных состояний у детей как основного заболевания при развитии СФЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен ретроспективный анализ данных пациентов в возрасте до 18 лет, обращавшихся в НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России с клиническим диагнозом СФЭ в период с 2012 по 2019 год. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НИИЦ ДГОИ. Проанализирована имеющаяся медицинская документация (выписки, результаты обследования). Всем пациентам провели генетическое обследование методом высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS) с использованием «иммунологической» панели, включающей 345 генов, мутации в которых приводят к развитию ПИДС. При этом отсутствие

Таблица

Генетическая характеристика пациентов с вторичным СФЭ

Пациент, пол	Возраст дебюта заболевания	Первично пораженный росток	Результат NGS	Окончательный диагноз
№ 1 Б.В., муж.	4 года	ИТП	В гене <i>WAS</i> в интроне 3 обнаружена замена одного нуклеотида в гемизиготном состоянии с.361-7T > A	ПИДС, синдром Вискотта–Олдрича
№ 2 Б.М., муж.	18 мес.	3-ростковая цитопения	В гене <i>NFKB1</i> обнаружена делеция одного нуклеотида с.1183delG в гетерозиготном состоянии	Общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН)
№ 3 В.Р., муж.	8 мес.	ИТП	В гене <i>PIK3CD</i> обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.3061G > A	ПИДС
№ 4 Г.С., жен.	5 мес.	АИГА + ИТП	В гене <i>PIK3CD</i> обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.859G > C	ПИДС
№ 5 З.В., муж.	7 лет	ИТП	В гене <i>RTEL1</i> обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.538+3A > G	ПИДС
№ 6 К.М., муж.	10 мес.	АИГА + ИТП	В гене <i>ADAMTS13</i> обнаружены два генетических варианта: 1) замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.527T > G; 2) инсерция одного нуклеотида в экзоне 29 (последний экзон) в гетерозиготном состоянии: с.4143dupA	Врожденная тромбоцитопеническая пурпура (врожденный дефицит <i>ADAMTS13</i>)
№ 7 Н.Д., муж.	12 лет	АИГА + ИТП	Не найдено патогенных мутаций в исследованной панели генов	ПИДС
№ 8 О.И., муж.	4 года	АИГА + ИТП	В гене <i>KRAS</i> обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.37G > T	ПИДС
№ 9 Х.П., жен.	8 лет	ИТП	В гене <i>KRAS</i> обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.64C > A	ПИДС
№ 10 П.Е., жен.	2 года	ИТП	Не найдено патогенных мутаций в исследованной панели генов; хромосомный микроматричный анализ: микродупликация участка длинного плеча 15 хромосомы; микроделеция 22 хромосомы, затрагивающая регион 22q11.21	ПИДС, синдром Ди Джорджи

мутаций, выявленное методом NGS с использованием данной панели, не является основанием для исключения диагноза ПИДС при наличии у пациента других критериев диагноза.

Для анализа были отобраны 14 пациентов с первичным диагнозом «синдром Фишера–Эванса». Медиана возраста дебюта заболевания составила 5,5 года (от 5 мес. до 16 лет). Соотношение по полу (мальчики:девочки) – 1,8:1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам генетического обследования 14 пациентов с СФЭ удалось выявить 10 (71,4%) детей, у которых СФЭ оказался вторичным. Медиана возраста дебюта заболевания у пациентов с вторичным СФЭ – 4 года, минимальный возраст – 5 мес.; максимальный – 12 лет. Распределение по полу (мальчики:девочки) – 7:3.

В группе вторичных СФЭ у одного пациента был диагностирован врожденный дефицит фермента ADAMTS13; у остальных пациентов выявлены различные ПИДС. Один пациент (мальчик) был отнесен к группе пациентов с первичными иммунодефицитами без выявленной мутации, поскольку клиническая картина и лабораторные признаки говорят о высокой вероятности ПИДС у данного пациента. Распределение по диагнозам и характеристике генетического дефекта представлено в *таблице*.

Диагноз «идиопатический синдром Фишера–Эванса» был у 4 (28,6%) пациентов; медиана возраста дебюта заболевания – 8,9 года (от 8 мес. до 16 лет). Распределение по полу (мальчики:девочки) – 1:1. У детей этой группы отсутствовали клинические и лабораторные данные, свидетельствующие о других системных заболеваниях; при проведении генетического обследования у них не выявили патогенных мутаций.

Среди пациентов с ранним дебютом заболевания (до 3 лет) оказалось 6 (42,9%) человек; у 5 из них при молекулярно-генетическом обследовании диагностировали ПИДС. Дебют заболевания после 3 лет был выявлен у 8 (57,1%) человек, в том числе у 5 с ПИДС.

У 5 (37,5%) из всех пациентов с СФЭ в дебюте заболевания наблюдалась изолированная ИТП; среди них было 4 (80%) пациента с ПИДС. Дебютировали с АИГА 3 (21,4%) пациента – все с идиопатическим СФЭ. Дебют одновременно с ИТП и АИГА наблюдался у 5 (35,7%) пациентов; 4 (80%) из них – с ПИДС. У 1 (7,2%) пациента в дебюте заболевания отмечена иммунная трехростковая цитопения, у него также был диагностирован ПИДС.

Положительную прямую пробу Кумбса выявили при обследовании у 12 (85,7%) из всех пациентов с СФЭ; отрицательную – у 2 (14,3%), в том числе у одного пациента диагностировали врожденный дефицит ADAMTS13, а второй имел идиопатический СФЭ. У 6 из 12 пациентов с положительной прямой пробой Кумбса удалось провести расширенное исследование: 4 (66,6%) пациента имели положительную прямую пробу Кумбса, опосредованную IgG, субкласс IgG1; 1 (16,7%) пациент – опосредованную IgG (16,7%) и 1 (16,7%) – опосредованную IgG и IgA.

Анализ терапии у пациентов с СФЭ показал, что при вторичном СФЭ 8 из 10 пациентов получали в первой линии терапию ГКС, у 6 (60%) из них отмечены рецидивы при снижении дозы или отмене ГКС. У одного пациента (с врожденным дефицитом ADAMTS13) изначально проводили лечение ВВИГ – ремиссия сохранялась в течение 2 лет; затем при рецидиве применяли комбинацию ГКС с ВВИГ – ремиссия сохранялась в течение 1 года, после этого вновь развился рецидив. Повторно ремиссия была достигнута после

введения ВВИГ без ГКС. У одной девочки с синдромом активированной PI3KD до момента постановки диагноза была достигнута ремиссия после лечения преднизолоном в дозе 2 мг/кг/сут, в течение 3 недель, одновременно с ВВИГ, в дальнейшем применяли 6 коротких курсов пульс-терапии метилпреднизолоном.

У 2 пациентов с вторичным СФЭ в качестве первой линии терапии использовали ВВИГ в монотерапии – с кратковременным эффектом.

Во второй линии терапии у 5 пациентов использовали ритуксимаб: у 3 (60%) пациентов был получен ответ; у 1 (20%) ремиссия после курса ритуксимаба сохранялась в течение 1 года, затем развился рецидив; у 1 (20%) пациента ответ на терапию ритуксимабом не получен.

У 4 пациентов проведена терапия микрофенолата мофетиллом (ММФ): ремиссия достигнута у 3 (75%); у одного пациента терапия была неэффективной. Среди других иммуносупрессивных препаратов применяли: циклофосфамид – у одного пациента (без эффекта); даназол – у одного (без эффекта) и сиролimus – у одного пациента с ОВИН (достигнута ремиссия).

Пациенты со вторичным СФЭ на фоне ПИДС после уточнения диагноза перешли под наблюдение иммунологов и получают терапию в соответствии с основным диагнозом.

Все пациенты с идиопатическим СФЭ (4 человека) в качестве первой линии терапии получили ГКС; после их отмены у всех развился рецидив. Максимальная длительность ремиссии у этих пациентов составила 1 мес.

В первой линии терапии 4 пациента получали ВВИГ одновременно с ГКС. У 1 (25%) пациентки длительная ремиссия сохранялась в течение 1 года, затем развился рецидив; у остальных ответ сохранялся непродолжительно (до 1 мес.).

Во второй линии терапии 3 пациента получали ритуксимаб: у одной пациентки после проведенного курса получен ответ, ремиссия сохранялась 1 год 3 мес.; после рецидива ответ вновь был достигнут после повторного введения ритуксимаба, ремиссия сохраняется в течение 10 мес. У одного пациента после курса ритуксимаба ремиссия сохранялась в течение 1 года, после этого развился рецидив, который потребовал смены терапии. У одного пациента до рецидива ремиссия сохранялась в течение 2 мес.

У одного пациента была предпринята попытка применения циклоспорина А, однако ответ на терапию не получен. Одному пациенту после терапии ритуксимабом назначили ММФ – ответ на терапию был получен, однако после отмены препарата ремиссия сохранялась в течение 1 года; при развитии рецидива ММФ назначили повторно. На сегодняшний день в исследуемой группе пациентов не зарегистрировано ни одного летального исхода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты сопоставимы с данными, опубликованными в работе *N. Aladjidi и соавт.*, касающимися характеристики пациентов с СФЭ: их процентное соотношение совпадает, несмотря на небольшую выборку больных в нашем исследовании. В нашей группе пациентов СФЭ также чаще встречался среди мальчиков; средний возраст дебюта заболевания составил 5,5 года (в исследовании *N. Aladjidi и соавт.* – 5,4 года); пик заболеваемости по возрасту не зафиксирован.

Вторичный СФЭ на фоне ПИДС развивался у мальчиков в 3,5 раза чаще, а идиопатический СФЭ одинаково часто встречался у мальчиков и девочек. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что более чем в половине случаев (71,4%) СФЭ у детей ассоциирован с ПИДС, что согласуется с данными, ранее опубликованными в исследовании *N. Aladjidi и соавт.* (у 60% детей СФЭ был ассоциирован с иммунными нарушениями). Примерно одинаковым оказалось число пациентов с ранним (до 3 лет) дебютом СФЭ и с дебютом заболевания после 3 лет; такое же распределение получено и среди больных с СФЭ, ассоциированным с ПИДС.

Среди первичных проявлений чаще встречается дебют заболевания, ассоциированный с ИТП (35,7% – в нашей группе пациентов и 29% – в исследовании *N. Aladjidi и соавт.*) или одновременно с ИТП и АИГА (35,7 и 46% соответственно); несколько реже начало заболевания связано с АИГА с последующим присоединением ИТП (21,4 и 25% соответственно). Очень редко встречается трехростковая иммунная цитопения: в работе *N. Aladjidi и соавт.* иммунная нейтропения в дебюте заболевания зафиксирована у 2 больных, а в нашем исследовании – у 1 пациента с СФЭ, ассоциированным с ПИДС. Среди наших пациентов с дебютом заболевания, ассоциированным с АИГА, ни в одном случае не было выявлено ПИДС.

Отмечена крайне низкая эффективность лечения ГКС и ВВИГ при СФЭ: практически в 100% случаев пациентам анализируемой группы требовалось назначение второй и последующих линий терапии. Среди других видов терапии, эффективных как при первичном, так и при вторичном СФЭ, следует отметить ритуксимаб (62% пациентов сохраняют ремиссию до 1 года) и ММФ (показана эффективность у 80% пациентов с сохранением ремиссии до 1 года).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно сделать вывод, что пациентам с СФЭ мужского пола до 18 лет, которые дебютировали с вовлечения тромбоцитарного звена, показано проведение углубленного иммунологического обследования с включением генетического анализа, так как у больных этой группы, по нашим данным, оказалась наиболее высокая частота встречаемости ПИДС. Возможно, для таких пациентов необходимо создать скрининговые панели обследования.

Лечение СФЭ ГКС и ВВИГ практически всегда требует назначения второй и последующих линий терапии. Препараты выбора, имеющие наибольшую эффективность среди пациентов, включенных в исследование, – ритуксимаб и ММФ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Kuzminova Z.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8586-8586>

Pashanov E.D. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0080-3367>

Pavlova A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3974-5662>

Kurnikova M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0900-6874>

Mersyanova I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0471-2956>

Plyasunova S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4503-0735>

Smetanina N.S. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8805-1499>

Литература

- Miano M. How I manage Evans syndrome and AIHA cases in children. *Br J Haematol* 2016; 172: 524–34.
- Aladjidi N, Jutand M.-A., Beaubois C., Fernandes H., Jeanpetit J., Coureau G., et al. Evans syndrome in children: long-term outcome in prospective French national observation cohort. *Front Pediatr* 2015; 3: 79.
- Michel M., Chanet V., Dechartres A., Morin A.S., Piette J.C., Cirasino L., et al. The spectrum of Evans syndrome in adults: new insight into the disease based on the analysis of 68 cases. *Blood* 2009; 114: 3167–72.
- Seidel M.G. Autoimmune and other cytopenias in primary immunodeficiencies: pathomechanisms, novel differential diagnoses, and treatment. *Blood* 2014; 124 (15): 2337–44.
- Mathew P.I., Chen G., Wang W. Evans syndrome: results of a national survey. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19 (5): 433–7.
- Jaime-Perez J.C., Elva P., Aguilar-Calderon P.E., Salazar-Cavazos L., Gomez-Almaguer D. Evans syndrome: clinical perspectives, biological insights and treatment modalities. *J Blood Med* 2018; 9: 171–84.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 05.04.2019

Принята к печати 10.06.2019

Комбинированное лечение диффузно-склерозирующего остеомиелита нижней челюсти у детей

А.Ю. Кугушев¹, А.В. Лопатин^{1,2}, С.А. Ясонов¹, Д.С. Сеницын¹

¹ Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва
² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Контактная информация:

Кугушев Александр Юрьевич, канд. мед. наук, врач – пластический хирург, детский хирург отделения челюстно-лицевой хирургии Российской детской клинической больницы РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.
 Адрес: 119571, Москва, Ленинский пр-кт, 117
 E-mail: drkugushev@gmail.com

Диффузный склерозирующий остеомиелит нижней челюсти (ДСО) – редкое и плохо изученное заболевание. Текущие протоколы лечения (стероидные или обезболивающие препараты, кортикотомия) не позволяют достичь хороших результатов или связаны с развитием потенциально серьезных побочных эффектов. Разработанный нами алгоритм лечения, включающий курсовую терапию бисфосфонатами, хорошо переносился и позволил достичь стойкой клинико-рентгенологической ремиссии в случае проведения предшествующей декорткации и антибактериальной терапии. Данный подход к лечению ДСО перспективен и требует дальнейшего исследования. Данное исследование поддержано Локальным этическим комитетом Российской детской клинической больницы.

Ключевые слова: диффузно-склерозирующий остеомиелит, бисфосфонаты

Кугушев А.Ю. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 46–53.
 DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-46-53

© 2019 by NMRC PHOI

Received 05.04.2019

Accepted 10.06.2019

Combined treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible in children

A.Yu. Kugushev¹, A.V. Lopatin^{1,2}, S.A. Yasonov¹, D.S. Sinityn¹

¹ Russian Children's Clinical Hospital of the Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
² Peoples' friendship University of Russia, Moscow

Diffuse sclerosing osteomyelitis of the jaw (DSO) is a rare and poorly understood disease. Nowadays treatment protocols (steroid or painkillers, corticotomy) do not capable of to get good and stable results or are associated with the development of potentially serious side effects. The treatment algorithm developed by us, including the course treatment with bisphosphonates, was well tolerated and capable of to get clinical and radiological remission in the case of previous decortication and antibacterial therapy was done. For these reasons, this treatment protocol is not without interest and need of further investigates. The study was approved by the Local Ethics Committee of Russian Children's Clinical Hospital.

Key words: diffuse sclerosing osteomyelitis, bisphosphonates

Кугушев А.Ю., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 46–53.
 DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-46-53

Correspondence:

Kugushev Alexander Yurevich, PhD, plastic surgeon, pediatric surgeon, Department of Maxillofacial Surgery, Russian Childrens' Clinical Hospital.
 Address: Russia 119571, Moscow, Leninsky Prospekt, 117
 E-mail: drkugushev@gmail.com

Диффузно-склерозирующий остеомиелит (ДСО) нижней челюсти – редкое заболевание, характеризующееся сильными рецидивирующими болями, отеком и тризмом. Рентгенологически, в зависимости от стадии заболевания, ДСО проявляется частичным остеолитом и склерозом, который со временем нарастает [1, 2]. Подходы к лечению сильно варьируют и включают длительный прием антибактериальных, стероидных и нестероидных препаратов, гипербарическую оксигенацию, кортикотомию с некрэктомией [2–6]. Некоторые авторы прибегали к обширным резекциям с микрососудистой реконструкцией [7]. Однако вышеупомянутые протоколы лечения не позволяют достичь стойкой ремиссии и уменьшения жалоб [4, 8, 9].

С 2001 года в печати появляются сообщения от групп авторов об успешном применении при ДСО бисфосфонатных препаратов [1, 9–14], большинство из них посвящено отдельным случаям. Кроме того, авторы использовали разные типы бисфосфонатов, разные пути их введения (пероральный и внутривенный) и разные протоколы.

В литературе описаны только три исследования, посвященные лечению ДСО бисфосфонатами [1, 9, 15]. М. Montonen и соавт. наблюдали 10 пациентов с ДСО, которые получали динатрий-клюдронат (безазотистый бисфосфонат) и плацебо [1]. В этом исследовании не отмечено различий в интенсивности снижения боли у пациентов, принимавших клудронат и плацебо, а также не выявлено статистически зна-

чимого различия через 12 мес. после первого введения. Такой результат мог быть связан с тем, что во время проведения исследования – в середине 1990-х годов (1992–1994) – высокоэффективные азотсодержащие бисфосфонаты еще не использовали. Однако через 6 мес. наблюдалось статистически значимое снижение интенсивности боли в группе пациентов, принимавших клодронат.

S.C. Kuijpers и соавт. лечили 7 пациентов с ДСО с использованием памидроната, высокоэффективного азотсодержащего бисфосфоната, который вводили 15 мг/день, внутривенно, в течение 3–5 дней (кумулятивная доза памидроната – 45–75 мг). Эту процедуру повторяли каждые 3 мес. в зависимости от динамики течения ДСО [9]. В двух случаях произведен переход на золедроновую кислоту и оладронат в связи со снижением ответа на терапию памидронатом. Все пациенты отмечали уменьшение боли. У 2 пациентов эпизодов болей не было в течение более 30 мес. наблюдения. Авторы пришли к выводу, что инфузии бисфосфоната могут обеспечить стойкую ремиссию и являются многообещающей альтернативой лечения. В то же время авторы подчеркнули необходимость уточнения протокола лечения относительно типа бисфосфоната и приведенной дозы [9].

Учитывая наш длительный успешный опыт использования азотсодержащих бисфосфонатов (алендроновой кислоты) при лечении детей с фиброзной дисплазией [16] и отсутствие в доступной литературе указаний об использовании данного препарата при лечении ДСО, было решено провести исследование эффективности данной терапии при этом заболевании. Аллендроновая кислота – это азотсодержащий препарат бисфосфонатного ряда второго поколения, широко использующийся при лечении остеопороза у взрослых [17] и *osteogenesis imperfecta* у детей [18, 19]. По сравнению с памидронатом, когда инфузия сопровождается головной болью и тошнотой, аллендронат переносится лучше [20].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В отделении челюстно-лицевой хирургии Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, с 2011 по 2018 год лечение по поводу ДСО получали 11 детей. Все пациенты были информированы о возможных альтернативных методах лечения (анальгетики, стероидные препараты, хирургическое лечение).

В исследование, одобренное Локальным этическим комитетом были включены 11 пациентов (8 девочек и 3 мальчика). Средний возраст на момент поступления составлял 10,1 года (от 6 до 15 лет).

Продолжительность жалоб варьировалась от 4 мес. до 8 лет (в среднем – 1,9 года). Болезнь локализовалась в нижней челюсти, с равной частотой справа и слева; в одном случае были поражены обе челюсти. Преобладало поражение в области угла и вертикальной ветви нижней челюсти. Родители пациентов дали согласие на использование информации о ребенке в научных исследованиях и публикациях.

Во всех случаях диагноз основывался на данных истории заболевания, клинических симптомах, результатах лучевой диагностики и гистопатологического исследования. Инициально всем пациентам были сделаны ортопантограммы и конусная компьютерная томография (КТ) по месту жительства с последующим проведением КТ с трехмерной реконструкцией; в двух случаях была проведена магнитно-резонансная томография (МРТ) в связи с подозрением на злокачественное образование.

Всем пациентам провели рутинное биохимическое исследование крови для исключения нарушений функции почек. Отслеживали развитие осложнений, а также симптомы, связанные с заболеванием. Средний период наблюдения за пациентами составил 21 мес. (от 9 до 37 мес.). Протокол лечения включал декортикацию и удаление 8-х молярных зубов с бактериологическим и патологоанатомическим исследованием удаленных материалов, проведением эмпирической антибактериальной терапии и последующим переводом на терапию аллендроновой кислотой в течение 6 мес.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст дебюта заболевания среди пациентов, принимавших участие в исследовании, составил 8,2 года, а их средний возраст при поступлении в стационар на лечение – 10,1 года. Среди пациентов преобладали девочки (таблица 1). Склонность женского пола к хроническому остеомиелиту, вероятнее всего, связана со свойствами эстрогена стимулировать остеогенез, однако контроль уровня эстрогенов в данном исследовании не проводили. В отличие от девочек, дебют заболевания у мальчиков был более ранний. Среди направляющих диагнозов преобладало подозрение на фиброзную дисплазию, что обусловлено принадлежностью этих двух заболеваний к группе фиброзно-костных поражений и сложностью их дифференциальной диагностики. Однако фиброзная дисплазия не дает болевого синдрома, а ее дебют наступает раньше. Один ребенок был исключен из исследования в связи с агрессивным методом лечения по месту жительства – удалением вертикальной ветки (рисунок 1). Этому ребенку планируется проведение реконструкции нижней челюсти.

Таблица 1

Возрастно-половой состав пациентов с ДСО с уточнением локализации и направляющим диагнозом

№	Пол	Дебют, лет	Поступление, лет	Направляющий диагноз	Локализация	
1	Жен.	5,6	6,9	Образование	Нижняя челюсть	справа
2	Жен.	3,5	6,8	Фиброзная дисплазия	Нижняя челюсть	справа
3	Жен.	10,6	11,6	Хронический лимфаденит, образование?	Нижняя челюсть	слева
4	Жен.	7,8	11,4	Хронический остеомиелит	Нижняя челюсть	справа
5	Муж.	9,0	9,3	Образование	Нижняя челюсть	слева
6	Жен.	10,8	11,4	Остеомиелит	Нижняя челюсть	слева
7	Муж.	6,2	6,5	Фиброзная дисплазия	Нижняя челюсть	слева
8	Жен.	13,9	15,0	Фиброзная дисплазия	Нижняя челюсть	слева
9	Жен.	5,9	13,2	Фиброзная дисплазия	Нижняя челюсть	справа
10	Жен.	10,4	11,4	Фиброзная дисплазия	Нижняя челюсть	справа
11	Муж.	6	7,9	Фиброзная дисплазия	Нижняя и верхняя челюсти	с двух сторон

Рисунок 1

Девочка, 13 лет, с диффузным склерозирующим остеомиелитом нижней челюсти (проведено агрессивное лечение по месту жительства); фото предоставлены с согласия родителей ребенка

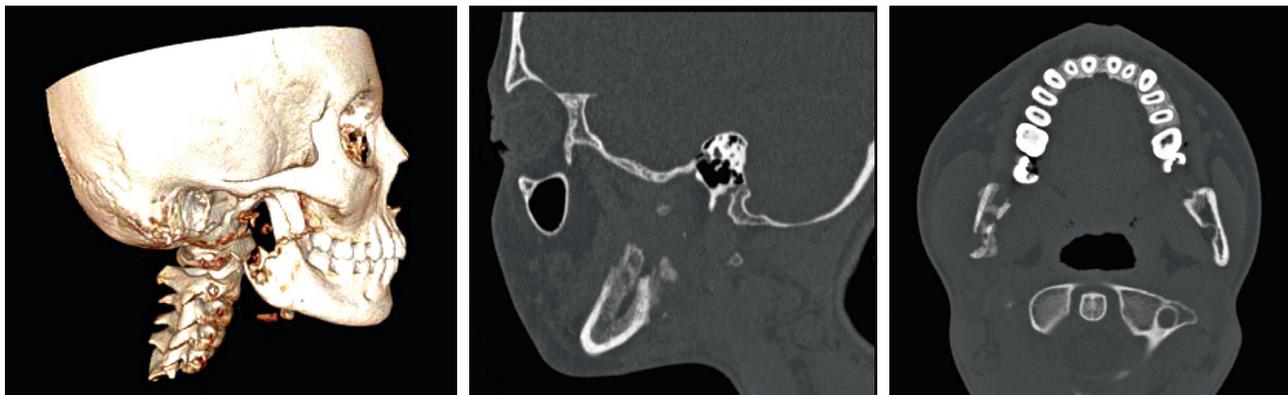


Таблица 2

Результаты посева удаленного материала

№	Пол	Возраст, лет	Выявленная флора
1	Жен.	6,9	Без роста
2	Жен.	6,8	<i>Streptococcus mitis</i>
3	Жен.	11,6	Нет данных
4	Жен.	11,4	<i>Streptococcus mitis</i>
5	Муж.	9,3	Нет данных
6	Жен.	11,4	Нет роста
7	Муж.	6,5	Нет роста
8	Жен.	15,0	<i>Streptococcus mitis</i>
9	Жен.	13,2	Нет роста
10	Жен.	11,4	<i>Streptococcus mitis</i>
11	Муж.	7,9	<i>Streptococcus mitis</i>

При проведении бактериологического исследования удаленных некротических масс (таблица 2) в 5 случаях выделяли различные концентрации колоний *Streptococcus mitis*, то есть условно-патогенную микрофлору, обладающую, однако, различной степенью резистентности к антибактериальным препаратам, в том числе препаратам выбора фторхинолонового и аминогликозидового рядов, но хорошей чувствительностью к пенициллиновой группе препаратов (пенициллин G, ванкомицин). В 4 случаях при бактериологическом исследовании не было получено роста; в 2 случаях исследование не проводили. Отметим, что у ребенка с мультифокальным остеомиелитом, не вошедшего в эту группу, данная группа микроорганизмов при посеве не получена, высевались только *Streptococcus oralis* и *Candida albicans*.

При оценке результатов КТ отмечено нарастание склероза в кортикальных отделах, которое было недостижимо при предыдущих попытках лечения. Типичный случай представлен на рисунке 2. На фоне терапии происходило нарастание общей плотности в зоне очага хронического остеомиели-

та – с $545,2 \pm 215,3$ до $622,36 \pm 183,2$ HU с последующим нарастанием плотности в области кортикального слоя.

В одном случае, у ребенка 8 лет с двусторонним поражением челюстей, рецидивирующим течением слева, после неоднократных попыток консервативного лечения и плоскостной резекции данная терапия позволила подавить процесс в зоне обострения, однако через 3 мес. после окончания терапии отмечали появление отека, тризма и болей справа, что потребовало повторного лечения. При выполнении КТ наблюдалось купирование воспалительного процесса слева с началом перестройки костей, при этом отмечено нарастание поражения справа (рисунки 3).

Мы считаем, что процесс декортикации с адекватной антибактериальной терапией и переводом на терапию бисфосфонатами – обязательная процедура, так как изолированная терапия не позволила достичь результата в зоне, где не проводили декортикацию и некрэктомию. Отметим, что этого ребенка обследовали в условиях иммунологического стационара: дефектов иммунной системы, обуславливающих множественное поражение костей черепа, данных за SAPHO-синдром не получено.

После начала терапии алендроновой кислотой 8 из 11 пациентов сообщили о сокращении использования болеутоляющих средств. При наличии отека и тризма на момент начала терапии данные симптомы нивелировались в течение 2–3 нед. Все пациенты, кроме одного, сообщили об общем улучшении самочувствия и качества жизни, включая увеличение периодов без жалоб. Никаких серьезных побочных эффектов, в том числе медикаментозного остеонекроза челюстей или нарушения функции почек, не зарегистрировано. Тем не менее у одной пациентки улучшение клинических симптомов ДСО наблюдали только на время терапии (6 мес.). Через 2 мес. по окончании терапии у этой девочки появились тризм, отек и боли при каждом начале месячных (рисунки 4), хотя по данным КТ была отмечена отчетливая положительная динамика в виде нарастания склероза, уменьшения зон разряжения. Данная ситуация расценена как невралгия n. mentalis, потребовавшая проведения декомпрессии нижнечелюстного канала, что позволило достичь стойкой ремиссии.

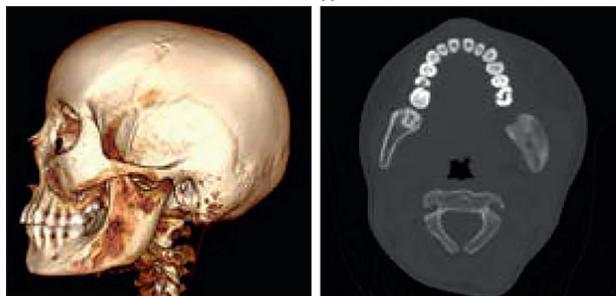
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

ДСО нижней челюсти – редкое заболевание с плохо изученной этиологией. Качество жизни пациентов с ДСО резко снижено из-за сильных, повторяющихся болей, функциональных нарушений, таких как тризм и отек лица [1], что часто приводит к длительному приему обезболивающих препаратов [9]. Ведение

Рисунок 2

Девочка У., 11 лет, ДСО нижней челюсти слева: до лечения, через 6 мес. без терапии, через 6 мес. после начала терапии (фото предоставлены с согласия родителей ребенка)

03.07.2017: до лечения



23.03.2018:
через 6 мес. после декортикации



19.10.2018:
через 6 мес. от начала терапии алендронатом

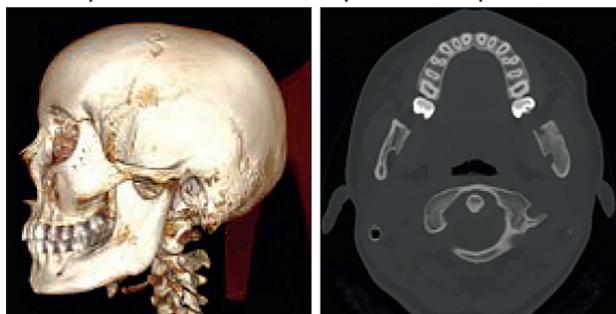


Рисунок 3

Мальчик К., 8 лет: бичелюстное поражение (фото предоставлены с согласия родителей ребенка)

До начала терапии алендронатом



На этапе обострения справа:
через 4 мес. от начала терапии алендронатом

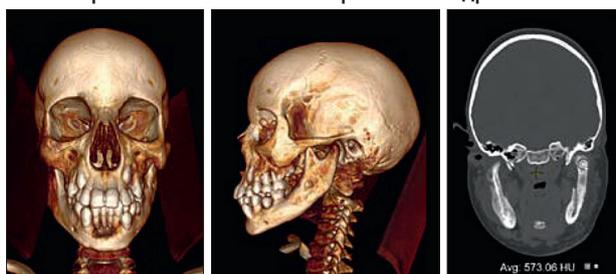
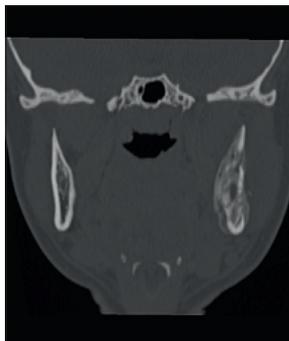


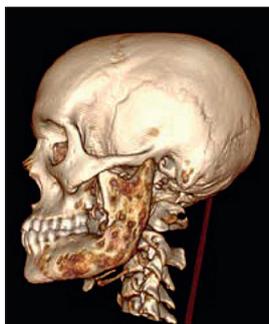
Рисунок 4

Девочка Ф., 15 лет: динамика плотности очагов остеомиелита по данным компьютерной томографии на этапах лечения (фото предоставлены с согласия родителей ребенка)

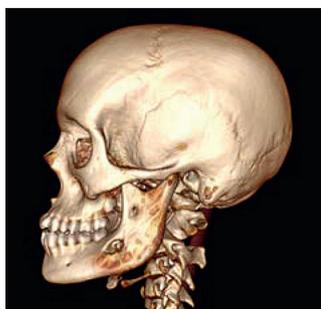
26.04.2016:
дебют заболевания



19.01.2018:
до терапии
алендроновой кислотой



23.01.2017:
перед изолированной
декортикацией



15.08.2018:
через 6 мес. от начала
терапии алендронатом



таких пациентов с использованием наиболее распространенных вариантов лечения, таких как антибиотиками, кортикостероиды или хирургическая декортикация, как правило, бывает неудовлетворительным и не позволяет достичь долговременного улучшения состояния [9].

В течение последнего десятилетия появились сообщения об успешном использовании бисфосфо-

натов как альтернативного лечения ДСО [1, 9–14]. К сожалению, терапия бисфосфонатами не является стандартом лечения ДСО, что связано с потенциальными рисками терапии. В первую очередь, многие клиницисты опасаются развития бисфосфонат-обусловленного остеонекроза челюстей, недавно переименованного в лекарственный остеонекроз, который происходит после длительного внутривенного введения бисфосфонатов [21–23]. Кроме того, некоторые азотсодержащие бисфосфонаты (золедронат и памидронат) чаще связаны с развитием остеонекроза челюстей [23–27]. По этим причинам целесообразно использовать однократное внутривенное введение азотсодержащего бисфосфоната высокой активности с благоприятным профилем риска, а именно ибандронат, применяемый только при острых обострениях ДСО как пульс-терапия, либо алендроновую кислоту длительным приемом в низкой дозе. Промежуток времени от момента введения препарата до снижения боли можно объяснить особенностями фармакокинетики и фармакодинамики азотсодержащих бисфосфонатов [28]. Период полувыведения ибандроната из плазмы составляет 10–60 ч, алендроната – 6 ч [29, 30], а период полураспада в кости – более 10 лет [28, 29]. После полувыведения приблизительно 50% введенной дозы связывается с гидроксипатитом кости, откуда он высвобождается остеокластами, что приводит к последующему апоптозу соответствующего остеокласта. Обезболивающее действие начинается через 48–72 ч, а продолжительность обезболивающего эффекта во всех случаях составляет несколько месяцев. Кроме того, длительный период полураспада бисфосфонатов в кости и последующее их накопление при длительном приеме приводит к увеличению периодов без боли или к более низкому уровню болей.

Этиология ДСО остается в значительной степени не изученной [31, 32]. В качестве этиологического фактора рассматривают ответ на бактериальный стимул, а также хронический периостит в результате мышечной гиперактивности [33, 34]. Однако концепция хронического тендопериостита из-за гипертонуса жевательных мышц как причины ДСО [34] не получила подтверждения. Хотя микробиологический или травматический стимул, по-видимому, возможен в качестве первоначального триггера, существует очень мало данных, которые подтвердили бы микробиологическую причину заболевания. В частности, образование гноя и синусового тракта никогда не встречается при ДСО [32, 34]. При микробиологическом исследовании пораженных костей, как правило, не наблюдается роста бактерий [34], а случаи выявления их роста можно объяснить загрязнением образцов, так как при трансоральной биопсии выявляется флора ротовой полости, а в случае наружно-

го подхода к биопсии – кожная флора [34]. О других микробиологических патогенах, особенно грибах или вирусах, в литературе данных нет [34]. По этим причинам лечение антибиотиками обычно не приводит к достоверному улучшению или даже излечению ДСО. Случаи улучшения при длительном лечении антибиотиками можно объяснить естественным течением заболевания [34, 35].

Современные теории не дают убедительного объяснения сложной феноменологии заболевания и механизма ответа ДСО на лечение бисфосфонатами [1, 9, 10, 36]. Существует мнение, что ДСО – это локализованная версия хронического рецидивирующего мультифокального остеомиелита [14, 36] или локализованный вариант SAPHO-синдрома [37, 38]. Наблюдаемый нами ребенок с изолированным двухчелюстным поражением может быть подтверждением данной теории.

Что касается клинического и рентгенологического проявления, характеризующегося остеолизом и образованием новой кости, решающая роль в развитии ДСО отводится несбалансированному сочетанию остеогенеза и остеолиза после первоначального стимула [38]. В этом отношении ключевую роль может сыграть система RANK/RANKL/OPG, которая имеет решающее значение для связи между остеокластами и остеобластами. Бисфосфонаты действуют главным образом на остеокласты, которые приводят к апоптозу, однако в высоких концентрациях описано их действие на остеобласты. По данным *M. Montonen*, в трех случаях использования ибандроната для лечения ДСО в длинных трубчатых костях было отмечено заметное снижение активности как остеобластов (остаза), так и активности остеокластов (остеокальцин) [39]. Инфузии бисфосфоната (2–3 мг каждые 4 нед. в течение 3–4 мес.), как правило, недостаточны для снижения активности остеобластов; вместо этого можно ожидать небольшого увеличения активности остеобластов. Однако при этих дозах возможно заметное снижение активности остеокластов как основной клетки-мишени при лечении бисфосфонатом. По этой причине можно предположить, что само заболевание, возможно, вызвано чрезмерной активностью остеокластов или нарушением взаимодействия и связи между остеокластами и остеобластами, что в свою очередь ведет к повышению активности остеобластов. Дополнительным эффектом антирезорбтивного лечения, способствующим хорошему клиническому ответу, может быть более низкий уровень экскреции медиаторов боли остеокластами из-за пониженной их активности [38, 40], однако нарушение локальных условий pH связано с патогенезом бисфосфонатного остеонекроза челюсти [41, 42]. Местное состояние тканей важно при заболеваниях челюстей и, к сожалению, до сих

пор недооценено. Примечательно, что использование высокоэффективных азотсодержащих бисфосфонатов – стандарт лечения при вышеупомянутом синдроме SAPHO. Принимая во внимание тесную взаимосвязь признаков и симптомов ДСО и SAPHO, а также потенциально близкую их этиологию, клиническое использование азотсодержащих бисфосфонатов высокой активности также представляется возможным.

Ограничением нашего исследования является его ретроспективный характер и отсутствие стандартизации в отношении измерения отека и тризма, что следует учитывать в будущих проспективных исследованиях. Тем не менее визуальная оценка плотности костной ткани по данным КТ в этом ретроспективном исследовании указывает на значительное и явное преимущество длительного приема малых доз азотсодержащего бисфосфоната (алендроновая кислота) в лечении ДСО. Конечно, эти данные должны быть подтверждены проспективными исследованиями, включающими измерение клинических и лабораторных маркеров, для улучшения понимания метаболизма челюстей как в здоровом состоянии, так и при заболеваниях.

Трудно объяснить, почему терапия алендронатом не сработала у одной из наших пациенток с очень длительной продолжительностью жалоб и множественными неудачными в прошлом методами лечения. Возможно, доза алендроната была для нее слишком низкой. Мы ввели этой пациентке деносумаб с хорошим результатом, так как предполагаем, что система RANK/RANKL/OPG играет значительную роль в ДСО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование алендроновой кислоты с целью достижения стойкой ремиссии хронического диффузно-склерозирующего остеомиелита и восстановления структуры костной ткани в зоне поражения, особенно при частых эпизодах обострения и неэффективности неоднократно проведенного ранее консервативного лечения, позволяет рекомендовать данный метод как рутинный при ведении пациентов с ДСО.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Kugushev A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6881-7709>

Lopatin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0043-9059>

Yasonov S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0319-3103>

Sinityn D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8612-8851>

Литература

- Montonen M., Kalso E., Pylkkaren L., Lindstrom B.M., Lindqvist C. Disodium clodronate in the treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis (DSO) of the mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30 (4): 313–7.
- Yoshii T., Nishimura H., Yoshikawa T., Furudoji S., Yoshioka A., Takenono I., et al. Therapeutic possibilities of long-term roxithromycin treatment for chronic diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47 (5): 631–7.
- Jacobsson S., Hollender L. Treatment and prognosis of diffuse sclerosing osteomyelitis (DSO) of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49 (1): 7–14.
- van Merkesteyn J.P., Groot R.H., Bras J., Bakker D.J. Diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible: clinical radiographic and histologic findings in twenty-seven patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1988; 46 (10): 825–9.
- Montonen M., Iizuka T., Hallikainen D., Lindqvist C. Decortication in the treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. Retrospective analysis of 41 cases between 1969 and 1990. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75 (1): 5–11.
- Suei Y., Tanimoto K., Miyauchi M., Ishikawa T. Partial resection of the mandible for the treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis: report of four cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55 (4): 410–5.
- Mari A., Morla A., Melero M., Schiavone R., Rodriguez J. Diffuse sclerosing osteomyelitis (DSO) of the mandible in SAPHO syndrome: a novel approach with anti-TNF therapy. Systematic review. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg* 2014; 42: 1990–6.
- Groot R.H., van Merkesteyn J.P., van Soest J.J., Bras J. Diffuse sclerosing osteomyelitis (chronic tendoperiostitis) of the mandible. An 11-year follow-up report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74 (5): 557–60.
- Kuijpers S.C., de Jong E., Hamdy N.A., van Merkesteyn J.P. Initial results of the treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible with bisphosphonates. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; 39 (1): 65–8.
- Soubrier M., Dubost J.J., Ristori J.M., Sauvezie B., Bussiere J.L. Pamidronate in the treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92 (6): 637–40.
- Sugata T., Fujita Y., Myoken Y., Kiriya T. Successful management of severe facial pain in patients with diffuse sclerosing osteomyelitis (DSO) of the mandible using disodium clodronate. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32 (5): 574–5.
- Hino S., Murase R., Terakado N., Shintani S., Hamakawa H. Response of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible to alendronate: follow-up study by ^{99m}Tc scintigraphy. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34 (5): 576–8.
- Compeyrot-Lacassagne S., Rosenberg A.M., Babyn P., Laxer R.M. Pamidronate treatment of chronic noninfectious inflammatory lesions of the mandible in children. *J Rheumatol* 2007; 34 (7): 1585–9.
- Yamazaki Y., Satoh C., Ishikawa M., Notani K., Nomura K., Kitagawa Y. Remarkable response of juvenile diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible to pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104 (1): 67–71.
- Otto S., Troeltzsch M., Burian E., Mahaini S., Probst F., Pautke C., et al. Ibandronate treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible: Pain relief and insight into pathogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 2015 Nov; 43 (9): 1837–42. DOI: 10.1016/j.jcms.2015.08.028. Epub 2015 Sep 6.
- Kugushev A.Yu., Lopatin A.V., Yasonov S.A. Ten years of experience of alendronate treatment of craniomaxillofacial fibrous dysplasia. *Pediatric hematology/oncology and immunopathology* 2018; 17 (3): 36–42. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-36-42
- Unal E., Abaci A., Bober E., Büyükgebiz A. Efficacy and safety of oral alendronate treatment in children and adolescents with osteoporosis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006 Apr; 19 (4): 523–8.
- Ward L.M., Denker A.E., Porras A., Shugarts S., Kline W., Travers R., et al. Single-dose pharmacokinetics and tolerability of alendronate 35- and 70-milligram tablets in children and adolescents with osteogenesis imperfecta type I. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Jul; 90 (7): 4051–6. Epub 2005 Apr 12.
- Bachrach L.K., Ward L.M. Clinical review: bisphosphonate use in childhood osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94 (2): 400–9.
- Ana Luiza A.A., Ivani N.S. Oral alendronate treatment for severe polyostotic fibrous dysplasia due to McCune-Albright syndrome in a child. A case report *International Journal of Pediatric Endocrinology* 2010; Article ID 432060: 1–4.
- Kwon T.G. Risk factors of medication-related osteonecrosis of the jaw. In: Otto S (ed.), *Medication-related osteonecrosis of the jaw*, 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer, 2014; 2743.
- Otto S., Kwon T.G., Assaf A.T. Definition, clinical features and staging of medication-related osteonecrosis of the jaw. In: Otto S (ed.), *Medication-related osteonecrosis of the jaw*, 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer, 2014; 4355.
- Then C., Harauf N., Otto S., Pautke C., von Tresckow E., Rohnisch T., et al. Incidence and risk factors of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients having undergone autologous stem cell transplantation. *Onkologie* 2012; 35 (11): 658–64.
- Bamias A., Kastritis E., Bamia C., Moulopoulos L.A., Melakopoulis I., Bozas G., et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2005; 23 (34): 8580–7.
- Abu-Id M.H., Acil Y., Gottschalk J., Kreuzsch T. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie* 2006; 10 (2): 73–81.

26. Hoff A.O., Toth B.B., Altdundag K., Johnson M.M., Warneke C.L., Hu M., et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaws in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (6): 826–36.
27. Otto S., Schreyer C., Hafner S., Mast G., Ehrenfeld M., Sturzenbaum S., et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws- characteristics, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg* 2012; 40 (4): 303–9.
28. Bartl L., von Tresckow E. Pharmacological aspects of antiresorptive drugs: bisphosphonates and denosumab. In: Otto S (ed.), *Medication-related osteonecrosis of the jaw*, 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer, 2014; 117.
29. Barret J., Worth E., Bauss F., Epstein S. Ibandronate: a clinical pharmacological and pharmacokinetic update. *J Clinical Pharmacol* 2004; 44 (9): 951–65.
30. Choi A., Gang H., Whang J., Gwak H. Pharmacokinetic characteristics of formulated alendronate transdermal delivery systems in rats and humans. *Drug Deliv* 2010 May; 17 (4): 249–54. DOI: 10.3109/10717541003680999
31. El-Mofty S. Chronic diffuse sclerosing osteomyelitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 36 (6): 898–904.
32. Jacobsson S. Diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. *Int J Oral Surg* 1984; 13 (5): 363–85.
33. Jacobsson S., Dahlen G., Moller A.J. Bacteriologic and serologic investigation in diffuse sclerosing osteomyelitis (DSO) of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54 (5): 506–12.
34. van Merkesteyn J.P., Groot R.H., Bras J., McCarroll R.S., Bakker D.J. Diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible: a new concept of its etiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 70 (4): 414–9.
35. van Merkesteyn J.P., Bakker D.J., van der Waal I., Kusen G.J., Egyedi P., van den Akker H.P., et al: Hyperbaric oxygen treatment of chronic osteomyelitis of the jaws. *Int J Oral Surg* 1984; 13 (5): 386–95.
36. Urade M., Noguchi K., Takaoka K., Moridera K., Kishimoto H. Diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible successfully treated with pamidronate: a long-term follow-up report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 114 (4): e9–e12.
37. Kahn M.F., Hayem G., Hayem F., Grossin M. Is diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible part of the synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteitis (SAPHO) syndrome? Analysis of seven cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78 (5): 594–8.
38. Montonen M., Li T.F., Lukinmaa P.L., Sakai E., Hukkanen M., Sukura A., et al. RANKL and cathepsin K in diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. *J Oral Pathol Med* 2006; 35 (10): 620–5.
39. Armstrong D.J., Wright S.A., Coward S.M., Finch M.B. Bone marker response in chronic diffuse sclerosing osteomyelitis treated with intravenous ibandronate. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 (7): 976–7.
40. Mantyh P. Bone cancer pain: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Pain* 2013; 154 (Suppl. 1): S54–S62.
41. Otto S., Hafner S., Mast G., Tischler T., Volkmer E., Schieker M., et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle? *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68 (5): 1158–61.
42. Otto S., Pautke C., Opelz C., Westphal I., Schwager J., Bauss F., et al. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68 (11): 2837–45.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 15.03.2019

Принята к печати 10.06.2019

ANKRD26-связанная тромбоцитопения как частный случай наследственной тромбоцитопении с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям

Я.А. Ердумаева, Д.В. Федорова, П.А. Жарков, М.А. Курникова, С.Г. Манн, Е.В. Райкина

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва***Контактная информация:**

Федорова Дарья Викторовна, врач-гематолог консультативного отделения НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: daria.fedorova@fccho-moscow.ru

Семейная ANKRD26-связанная тромбоцитопения (ранее известная как тромбоцитопения-2) – редкая форма наследственной тромбоцитопении, характеризующаяся низким риском геморрагических осложнений и предрасположенностью к развитию злокачественных заболеваний крови. Пациентам с ANKRD26-связанной тромбоцитопенией и их родственникам требуются генетические консультации, последующее наблюдение и выбор оптимального лечения в случае развития острого лейкоза и других злокачественных заболеваний крови. В статье представлены описание клинического наблюдения данной патологии у двух сиблингов и анализ доступной литературы, посвященной патогенетическим аспектам и тактике ведения пациентов с этим редким заболеванием. Кроме того, рассмотрены общие вопросы диагностики и терапии у пациентов с заболеваниями из группы наследственных тромбоцитопений с предрасположенностью к развитию злокачественных заболеваний крови. Родители пациентов дали согласие на использование информации о ребенке в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: дети, геморрагический синдром, семейная тромбоцитопения, наследственная патология тромбоцитов, синдромы наследственной предрасположенности к злокачественным заболеваниям, ANKRD26

Ердумаева Я.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 54–61. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-54-61

© 2019 by NMRC PHOI

Received 15.03.2019

Accepted 10.06.2019

ANKRD26-related thrombocytopenia: case report and literature review of inherited thrombocytopenias with predisposition to malignancies

Ya.A. Erdomaeva, D.V. Fedorova, P.A. Zharkov, M.A. Kurnikova, S.G. Mann, E.V. Raykina

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

ANKRD26-related thrombocytopenia (previously known as thrombocytopenia-2) is a rare form of inherited platelet disorders. Patients with ANKRD26-related thrombocytopenia usually do not suffer from severe bleeding but have predisposition to acute myeloid leukemia and other malignancies. Patients with ANKRD26-related thrombocytopenia and their relatives need genetic consultation and long term follow-up in view of risk of malignant blood disorders. The clinical case of ANKRD26-related thrombocytopenia in two siblings is presented in this paper. Review of literary data on pathogenesis, treatment and follow-up of patients with ANKRD26-related thrombocytopenia is performed. Common questions of diagnosis and management in patients with congenital thrombocytopenias with predisposition to malignant blood disorders are also reviewed. Parents gave their permission for using personal data for clinical research and publications.

Key words: children, bleeding, congenital thrombocytopenia, inherited platelet disorders, germline predisposition to malignant disorders, ANKRD26

Erdomaeva Ya.A., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 54–61. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-54-61

За последние 15 лет знания в области наследственных тромбоцитопений (НТ) значительно расширились. На сегодняшний день в группу НТ входит более 30 заболеваний, вызванных мутациями более чем в 25 генах и характеризующихся

различной степенью тяжести тромбоцитопении и большой вариабельностью прогноза [1]. Постановка точного диагноза НТ затруднительна по многим причинам. Во-первых, как и в случае многих других редких болезней, врачи склонны подозревать наиболее

распространенные заболевания, характеризующиеся тромбоцитопенией. Во-вторых, для постановки точного диагноза требуются сложные лабораторные методы диагностики, которые доступны только в крупных специализированных центрах. Как следствие, многим пациентам с НТ устанавливают неправильный диагноз и назначают неэффективное лечение [2]. При этом сохраняется проблема недостаточной диагностики НТ, связанной с низкой эффективностью сбора семейного анамнеза. После комплексного диагностического обследования примерно у 40–50% пациентов с выраженной картиной НТ диагностика по-прежнему вызывает трудности, поскольку у этих пациентов имеются генетические заболевания, но точный молекулярный дефект еще не выявлен [3].

Тщательный анализ данных сотен пациентов с НТ показал, что, имея различные формы НТ, они подвержены риску развития различных заболеваний в детском или взрослом возрасте, в том числе жизнеугрожающих. В частности, при некоторых формах НТ выше риск развития злокачественных заболеваний крови, при других формах повышен риск развития почечной недостаточности, катаракты и потери слуха, есть также НТ с предрасположенностью к развитию синдрома недостаточности костного мозга [1, 4]. В связи с этим данные пациенты и их родственники требуют соответствующего генетического консультирования и тщательного наблюдения. Своевременная идентификация пациентов с НТ и определение конкретной нозологической формы важны для оценки прогноза пациентов и их родственников, проведения генетических консультаций, персонализации последующего наблюдения и выбора оптимального лечения в случае развития дополнительных заболеваний.

По нашим данным, на сегодняшний день в отечественной литературе нет описаний ANKRD26-связанной тромбоцитопении. Ниже мы описываем семью с ANKRD26-связанной тромбоцитопенией. Родители пациентов и взрослые больные дали согласие на использование их данных для исследования и публикации.

Клиническое наблюдение

Пациентка И., 2011 г.р., развивалась согласно возрасту, пороков внутренних органов и внешнего дисморфизма не было. В общем анализе крови (ОАК) в первые сутки жизни количество тромбоцитов – $230 \times 10^9/\text{л}$; позже этот показатель в гемограмме регулярно не исследовали. С 4-летнего возраста у девочки отмечен геморрагический синдром в виде легкого появления множественных крупных экхимозов на ногах. В возрасте 4,5 года впервые выявлено снижение тромбоцитов до $58 \times 10^9/\text{л}$; изменения количества или морфологии других клеточных элементов крови не отмечали. По данным миелограм-

мы, выполненной по месту жительства, выявлено небольшое количество мегакариоцитов со слабой «отшнуровкой» тромбоцитов. Учитывая кожный геморрагический синдром и тромбоцитопению, ребенку был выставлен диагноз «иммунная тромбоцитопения» (ИТП). Специфическую терапию не назначали в связи с умеренной выраженностью тромбоцитопении и отсутствием клинически значимых кровотечений. В дальнейшем сохранялись тромбоцитопения в пределах $44\text{--}79 \times 10^9/\text{л}$, умеренный кожный геморрагический синдром в виде посттравматических экхимозов и петехий, редко – носовые кровотечения.

В возрасте ребенка 5 лет родители обратились за консультацией гематолога в консультативное отделение НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (далее – НМИЦ ДГОИ) с жалобами на легкое появление экхимозов, периодические носовые кровотечения. При осмотре были выявлены единичные петехиальные элементы на коже туловища и конечностей, единичные экхимозы на коже нижних конечностей. Семейный анамнез показал, что отец ребенка наблюдается у гематолога с гормонрезистентной формой хронической ИТП. Диагноз был установлен в возрасте 18 лет; количество тромбоцитов сохраняется на уровне $30 \times 10^9/\text{л}$ (в более раннем возрасте этот показатель достоверно не известен); периодически беспокоят носовые кровотечения (обильные носовые кровотечения отмечались и в детском возрасте); также имели место длительные (до нескольких суток) кровотечения после удаления зубов. У бабушки по линии отца в зрелом возрасте обнаружили тромбоцитопению – $58 \times 10^9/\text{л}$; длительность ее неизвестна. В семье есть два младших сына, 2014 г.р., – разнояйцевые близнецы. У одного брата (пациент М.) тромбоцитопению диагностировали в возрасте 1,5 года (количество тромбоцитов – около $30 \times 10^9/\text{л}$); второй брат здоров.

По результатам обследования в НМИЦ ДГОИ у пациентки И. в ОАК подтверждена тромбоцитопения – до $46 \times 10^9/\text{л}$; имеются легкая гипохромия и микроцитоз эритроцитов на фоне нормальной концентрации гемоглобина. По результатам морфологии тромбоцитов повышено количество микроформ. При исследовании функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) методом цитофлуориметрии с активацией изменений не выявлено. По результатам миелограммы из двух точек оба пункта – со сниженной клеточностью, полиморфные, сходные между собой по составу, нейтральный жир в умеренном количестве. Мегакариоцитарный росток расширен, отмечается скудная «отшнуровка» тромбоцитов в 3–5% мегакариоцитов. Остальные ростки кроветворения сохранены. Цитогенетических нарушений в клетках костного мозга не выявлено. Учитывая отягощенный

семейный анамнез, пациентке И. методом высокопроизводительного секвенирования ДНК из клеток периферической крови был произведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с тромбоцитопениями, тромбоцитопатиями, коагулопатиями (таргетная панель «Тромбоцитопении, тромбоцитопатии»). В гене *ANKRD26* в 5'-нетранслируемой области была обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.-118С > А, описанная в литературе как патогенная при *ANKRD26*-связанной тромбоцитопении [4]. Данная замена подтверждена методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

На основании полученных данных пациентке поставлен диагноз: семейная (наследственная) *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения (*ANKRD26* с.-118С > А).

Через год от начала обследования пациентки И. было проведено комплексное обследование пациента М. в условиях НМИЦ ДГОИ. Из анамнеза известно, что впервые тромбоцитопения (около $30 \times 10^9/\text{л}$) обнаружена у него в возрасте 1,5 года; в это же время родители отмечали у ребенка склонность к появлению экхимозов, периодические необильные носовые кровотечения, однократно – субконъюнктивальное кровоизлияние. При осмотре был выявлен умеренный кожный геморрагический синдром в виде многочисленных экхимозов диаметром до 1 см на конечностях, единичные – на коже туловища. По результатам дополнительных обследований: тромбоцитопения – до $52 \times 10^9/\text{л}$; выраженных изме-

нений морфологии или функциональной активности тромбоцитов не выявлено.

По результатам генетического исследования отца детей и пациента М. была выявлена патогенная мутация в гене *ANKRD26* методом секвенирования по Сэнгеру. Верифицирован диагноз: семейная (наследственная) *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения (замена с.-118С > А в гене *ANKRD26*). Случаи ОМЛ, МДС или других гематологических злокачественных заболеваний в семье не наблюдались (рисунки 1). Семье были даны общие рекомендации по профилактике и лечению кровотечений, подготовке к инвазивным процедурам и стоматологическому лечению, рекомендовано динамическое наблюдение у педиатра и гематолога.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Диагностика НТ. Диагностический поиск конкретной формы НТ можно схематически разделить на два больших этапа. Первый этап – отбор пациентов, вероятнее всего, имеющих генетическую форму, среди общего числа пациентов с изолированной тромбоцитопенией. Второй этап – поиск конкретного генетического расстройства.

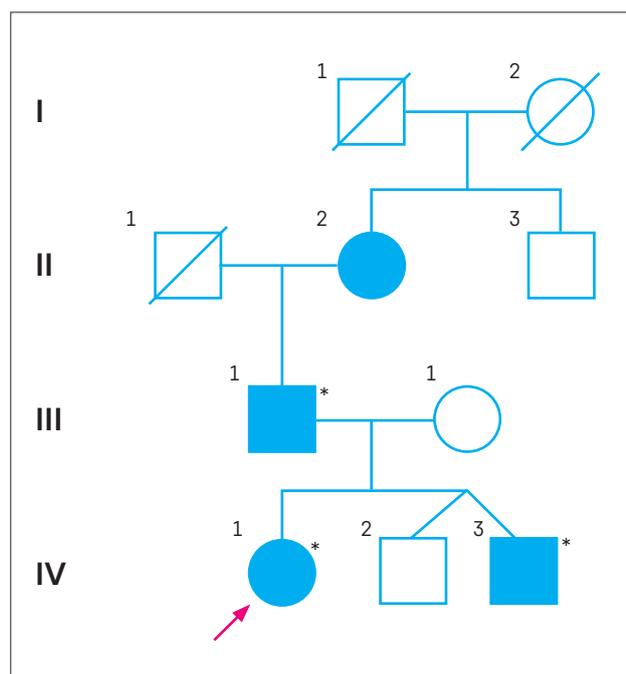
При дифференциальной диагностике пациентов с количеством тромбоцитов ниже $150 \times 10^9/\text{л}$ необходимо учитывать возможность наследственного генеза данной тромбоцитопении, особенно в случаях, когда невозможно установить количество тромбоцитов в более ранних анализах крови с момента рождения. Доказано, что существует вариабельность нормального диапазона количества тромбоцитов, связанная с гендерными, возрастными, а также этническими характеристиками. У здоровых людей данная вариабельность в значительной степени ответственна за физиологическое снижение количества тромбоцитов ($< 150 \times 10^9/\text{л}$) [5]. Требуется тщательная оценка клинической картины и семейного анамнеза у пациентов с тромбоцитопенией легкой степени тяжести.

Часто при НТ умеренная тромбоцитопения обнаруживается случайно у бессимптомного пациента при проведении планового ОАК в случае отсутствия в течение жизни ситуаций повышенного риска развития значимой кровоточивости, таких как операция, удаление зуба, роды или прием препаратов, вызывающих дисфункцию тромбоцитов (например, аспирин). В детской гематологии чаще встречаются пациенты с синдромальными формами НТ, ассоциированными с врожденными дефектами.

Отсутствие данных о том, что у других членов семьи имеется тромбоцитопения, не исключает наследственную причину, поскольку патогенетические мутации могут возникать *de novo*, а некоторые на-

Рисунок 1

Генеалогическое древо семьи (стрелкой указан пробанд – пациентка И.)



* Члены семьи, которым было выполнено молекулярно-генетическое исследование.

следственные тромбоцитопении наследуются рецессивно. Также целесообразно уточнить наличие у членов семьи заболеваний, риск развития которых может быть повышен при отдельных формах НТ. В случае форм с аутосомно-доминантным типом наследования важно помнить о явлении неполной пенетрантности мутантного гена. В литературе описаны случаи нормального количества тромбоцитов у носителей мутации в семьях с различными формами НТ [3].

Исследование мазка периферической крови обязательно при первоначальной оценке всех пациентов с тромбоцитопенией и может выявить характерные аномалии тромбоцитов, эритроцитов или лейкоцитов. Оценка размера тромбоцитов – ключевой инструмент дифференциальной диагностики наследственной и приобретенной тромбоцитопении, а также она важна при проведении дифференциальной диагностики различных форм НТ. Для дифференциальной диагностики с ИТП используют автоматический подсчет фракции незрелых тромбоцитов (%IPF): повышение показателя %IPF связано с усилением деструкции тромбоцитов в периферической крови.

Существуют также специфические лабораторные тесты для диагностики конкретных форм НТ. Тест агрегации тромбоцитов с ристоцетином и проточная цитометрия позволяют поставить диагноз «синдром Бернарда–Сулье, биаллельная форма», а также «болезнь Виллебранда тромбоцитарного типа». Иммунофлуоресцентный анализ белка МУН9 на предметных стеклах позволяет легко распознать типичные белковые агрегаты в нейтрофилах, которые присутствуют у пациентов с МУН9-связанной тромбоцитопенией. Данный тест показал 100%-ю чувствительность и 95%-ю специфичность для диагностики МУН9-связанной тромбоцитопении [6].

Современные методы высокопроизводительного секвенирования ДНК для параллельного скрининга различных мутаций в ближайшем будущем могут стать основным методом диагностики НТ, поскольку становятся все более эффективными и менее дорогостоящими. Таким образом, одношаговое секвенирование всех потенциальных генов в качестве базового диагностического подхода у пациентов с подозрением на НТ может оказаться более экономически эффективным, чем применение широкого спектра различных лабораторных тестов с дальнейшим исследованием наиболее вероятных генов для анализа.

НТ с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям. Впервые наследственный характер развития острых лейкозов был описан в 1922 году, но первое молекулярное объяснение наследственной предрасположенности к острому миелоидному лейкозу (ОМЛ)

было получено после открытия в 1999 году патогенной герминальной мутации гена *RUNX1* [7, 8].

На сегодняшний день выделяют три наследственные формы тромбоцитопении с доказанной предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям: семейная тромбоцитопения с предрасположенностью к ОМЛ (FPD/AML – от англ. *familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia*), ANKRD26-связанная тромбоцитопения и ETV6-связанная тромбоцитопения [1]. В отечественной литературе описаны две семьи из России с FPD/AML [9, 10]. Последний пересмотр классификации миелоидных новообразований и острых лейкозов ВОЗ от 2016 года подтвердил существование этой группы НТ и ввел новую категорию заболеваний, определяемых как «миелоидные новообразования с наследственной предрасположенностью и предсуществующими тромбоцитопениями» [11]. К сожалению, это определение не точное, потому что у пациентов с ETV6-связанной тромбоцитопенией в большинстве случаев развивается острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

Данная группа НТ обладает рядом важных общих характеристик, таких как аутосомно-доминантный тип наследования, тромбоцитопения легкой и средней степени тяжести и нормальный (или почти нормальный) размер тромбоцитов. Более того, при всех трех заболеваниях по результатам исследования костного мозга определяется нормальное или увеличенное количество мегакариоцитов, как правило, с признаками дисплазии в виде гиполобулированных ядер небольших размеров и скудной «отшнуровкой» тромбоцитов. Другие ростки кроветворения исходно не поражены. В связи с наличием дисмегакариопоэза описаны случаи ошибочной постановки диагноза миелодиспластического синдрома (МДС), форма рефрактерной цитопении с однолинейной дисплазией (рефрактерная тромбоцитопения), согласно классификации миелоидных новообразований ВОЗ 2008 года. Однако диагноз «МДС с рефрактерной тромбоцитопенией» встречается крайне редко (до 0,1–2% случаев) [2]. Таким образом, в случае обнаружения дисмегакариопоэза у пациента с изолированной тромбоцитопенией диагноз НТ следует рассматривать как гораздо более вероятный, чем диагноз МДС.

С другой стороны, клинически значимой разницей при дифференциальной диагностике является сохранение нормальной функции тромбоцитов при ANKRD26-связанной тромбоцитопении и ETV6-связанной тромбоцитопении, в отличие от сложного дефекта тромбоцитов при FPD/AML, которая приводит к нарушению агрегации тромбоцитов и высвобождения плотных гранул, а иногда и к тяжелой кровоточивости, не соответствующей выраженности тромбоцито-

пении. Вероятнее всего, это связано с тем, что мутация в гене *RUNX1* при FPD/AML вызывает нарушение регуляции экспрессии легкой цепи миозина тромбоцитов, приводящей к тромбоцитопатии [12].

Тем не менее отметим, что все перечисленные генетические дефекты ведут к нарушению баланса между пролиферацией и дифференцировкой кроветворных предшественников за счет усиленной пролиферации. К тому же при острых лейкозах часто обнаруживают соматические мутации в гене *RUNX1*, а также в гене *ETV6*, реже – в гене *ANKRD26*, что подтверждает роль *RUNX1*, *ANKRD26* и *ETV6* в развитии и семейных, и спорадических острых лейкозов и МДС.

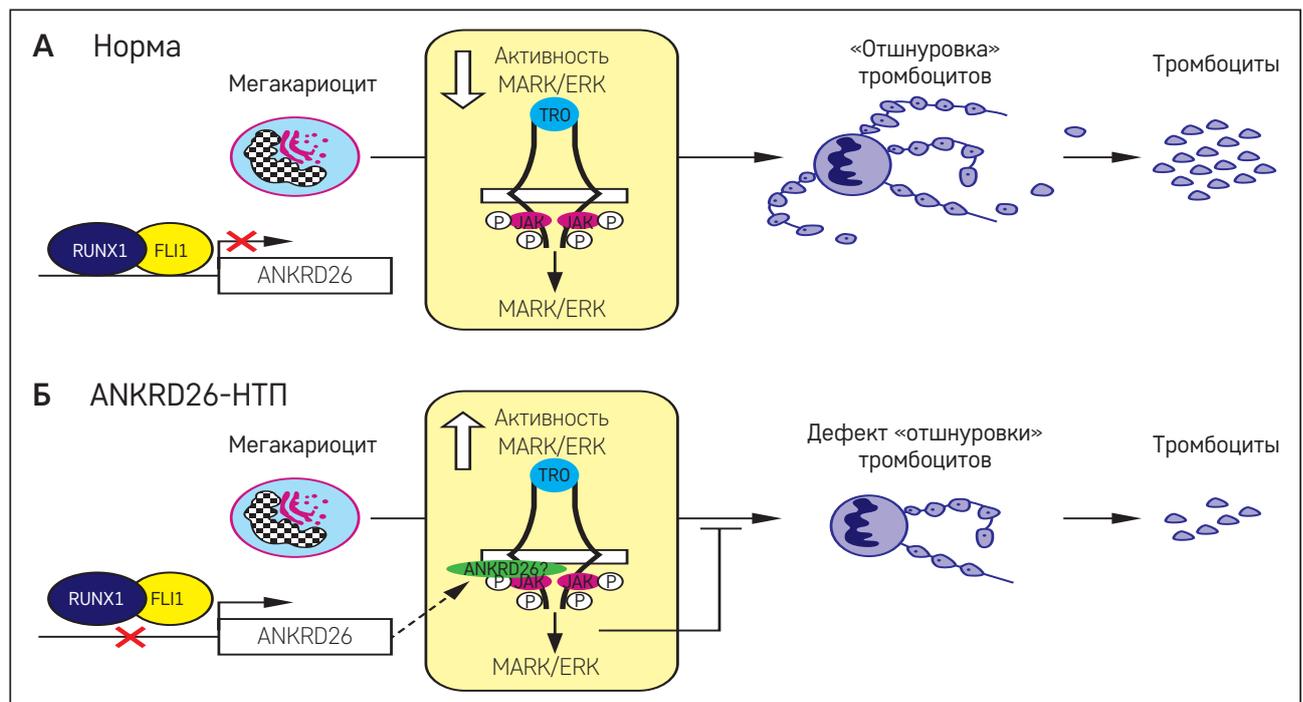
ANKRD26-связанную тромбоцитопению (тромбоцитопению-2) вызывают моноаллельные точечные мутации в 5'-нетранслируемой области гена *ANKRD26*, функция которого до конца не известна. Мутации в 5'-нетранслируемой области гена *ANKRD26* ответственны за дефектное связывание факторов транскрипции *RUNX1/FLI1* с геном *ANKRD26*, что приводит к отсутствию снижения экспрессии этого гена в зрелых мегакариоцитах, которое наблюдается в норме. Постоянная экспрессия *ANKRD26* в зрелых мегакариоцитах сопровождается усилением сигнального пути TPO/MPL и нижестоящего сигнального пути MARK/ERK [13]. Важно отметить, что данная гипотеза была подтверждена коррекцией дефекта «отшнуровки» тромбоцитов в клеточной линии мегакариоцитов пациентов с

ANKRD26-связанной тромбоцитопенией на фоне использования ингибитора MEK [13]. Следовательно, наблюдаемую гиперактивацию пути MARK/ERK у пациентов с *ANKRD26*-связанной тромбоцитопенией можно будет рассматривать в будущем как терапевтическую мишень для контроля тромбоцитопении. Интересно отметить, что подобный дефект мегакариопоэза на поздних стадиях наблюдается у пациентов с FPD/AML [7]. Сигнальный путь TPO/MPL регулирует не только мегакариопоэз, но также поддержание пула гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на протяжении жизни. Вероятно, *ANKRD26*-опосредованная дисрегуляция сигнальных путей в ГСК способствует лейкемической трансформации [14]. Доказано, что активация сигнального пути MARK приводит к увеличению пролиферации и выживаемости злокачественных клеток при раке молочной железы, раке толстой кишки, меланоме и немелкоклеточном раке легких [15].

По-видимому, *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения – одна из наиболее частых форм НТ. В итальянском исследовании 274 семей с НТ *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения была обнаружена у 20% пациентов с подтвержденным молекулярным диагнозом [16]. При дальнейшем исследовании выявленных пациентов с *ANKRD26*-связанной тромбоцитопенией (222 случая) было обнаружено, что у них существует повышенный риск развития миелоидных злокачественных новообразований: у 4,9%

Рисунок 2

Патогенез развития тромбоцитопении у пациентов с мутациями в гене *ANKRD26* [13]



Примечания: **А** – у здорового человека комплекс *RUNX1/FLI1* негативно регулирует экспрессию гена *ANKRD26* в мегакариоцитах, прогрессивно снижая активность пути TPO/MPL/MARK/ERK во время дифференцировки мегакариоцитов, в результате этого происходит «отшнуровка» тромбоцитов; **Б** – у пациентов с *ANKRD26*-связанной тромбоцитопенией мутации в 5'-UTR гена *ANKRD26* нарушают процесс ингибирования *RUNX1/FLI1*, что приводит к патологической экспрессии *ANKRD26* в мегакариоцитах. *ANKRD26* накапливается во внутренней части клеточной мембраны и опосредованно, через TPO/MPL, приводит к гиперактивации пути MARK/ERK с последующим глубоким дефектом в образовании тромбоцитов.

пациентов развился ОМЛ (возраст манифестации – 40–60 лет); у 2,2% – МДС (возраст манифестации – 35–70 лет) и у 1,3% – хронический миелолейкоз (ХМЛ) (возраст манифестации – 30–65 лет). По результатам ретроспективного исследования данной выборки пациентов, частота встречаемости ОМЛ, МДС и ХМЛ составила 123 (ДИ: 62–221), 56 (ДИ: 18–131) и 34 (ДИ: 7–98) соответственно на 100 тыс. населения и оказалась значительно выше, чем частота встречаемости ОМЛ, МДС и ХМЛ в общей популяции (5,2; 4,5 и 1,6 на 100 тыс. населения, по данным Национального института онкологии США). Таким образом, у 8% пациентов с ANKRD26-связанной тромбоцитопенией было отмечено развитие злокачественного заболевания крови [17] (рисунки 1, 2).

Алгоритм ведения пациентов с НТ с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям. Распространенность наследственных гемобластозов на сегодняшний день точно не известна; предполагается, что по меньшей мере у 4–13% пациентов до 18 лет и 5% взрослых пациентов ОМЛ/МДС носит наследственный характер [18].

Оптимальный подход к клиническому наблюдению пациентов с герминальными мутациями, ассоциированными с развитием острого лейкоза и других миелопролиферативных заболеваний, неизвестен. Согласно рекомендациям отдела по оценке риска развития острого лейкоза Чикагского университета, первоначальная базовая гематологическая оценка должна включать ОАК, HLA-типирование и пункцию костного мозга (КМ) с цитогенетическим исследованием клеток КМ [19]. При отсутствии лабораторных изменений пациенты сдают ОАК каждые 6–12 мес.; в случае выявления отклонений в ОАК проводится повторная пункция КМ с цитогенетическим исследованием КМ. Если в костном мозге нет признаков поражения, то повторный ОАК следует выполнять ежемесячно, а повторную пункцию КМ – через 3–4 мес. по аналогии с рекомендациями по наблюдению пациентов с врожденными аплазиями КМ. Другие авторы в качестве первоначальной гематологической оценки предлагают только проведение ОАК [18].

Особенности лечения пациентов с НТ с развитием клонального поражения костного мозга. Большинство экспертов считает, что пациентам с острым лейкозом, возникшим на фоне наследственной предрасположенности, целесообразно проводить аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) независимо от прогностических маркеров с использованием клеток донора, у которого доказано отсутствие герминальной мутации. Данный подход обоснован необходимостью полной эрадикации не только злокачественного клона кро-

ветворения, но и нормального клона кроветворения с предрасположенностью к гемобластозам [18, 19]. Данный подход не является универсальным и требует дополнительных исследований. При этом следует отметить, что ОМЛ у пациентов с герминальной мутацией гена *CEBPA* характеризуется высокой химиочувствительностью и риском развития последующих первичных миелоидных злокачественных новообразований, которые обычно называют «рецидивами», но они таковыми не являются [18]. Другие наследственные формы острых лейкозов могут обладать аналогичными характеристиками с точки зрения химиочувствительности и риска последующих первичных острых лейкозов или МДС [18, 19].

Лечащим врачам необходимо заблаговременно приступать к поиску подходящего донора для аллогенной ТГСК для пациентов с НТ с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям, которым планируется проведение аллогенной ТГСК. Всякий раз, когда доступен родственный донор, крайне важно исключить наличие у него герминальной мутации, поскольку ТГСК от родственного донора может привести к повторному развитию острого лейкоза из донорских клеток. Теоретически риск развития острого лейкоза/МДС у родственного донора потенциально увеличивается после процедуры мобилизации стволовых клеток. У таких доноров зачастую отмечают также высокий риск неудачного афереза стволовых клеток; примерно в 7% случаев неудачи связаны с наличием герминальной мутации линии [18, 20].

Особенности верификации диагноза НТ у пациентов с клональным поражением костного мозга. Зачастую диагноз НТ с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям устанавливают после диагностики острого лейкоза или МДС. В первую очередь это связано с легкой степенью тромбоцитопении и отсутствием кровоточивости у пациента. В последнее время после пересмотра классификации миелоидных новообразований ВОЗ от 2016 года диагностика наследственных синдромов с предрасположенностью к ОМЛ/МДС была включена в большинство стандартных диагностических алгоритмов. Для центров, проводящих генетическое тестирование опухолевых клеток на мультигенной панели высокопроизводительного секвенирования, включающей гены *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, эксперты советуют проводить оптимизацию таких тестов для обнаружения всех вариантов герминальных мутаций в этих генах и стремиться к инициальному генетическому исследованию опухолевых клеток и здоровых клеток для максимального выявления и оптимизации лечения пациентов с герминальными мутациями [21].

Основной материал для генетического тестирования на наличие герминальных мутаций – периферическая кровь (ПК), однако при гемобластозах ПК содержит опухолевые клетки. Возрастные клональные изменения гемопоэза также усложняют анализ ПК, так как у 1% здоровых пациентов в возрасте до 50 лет и у 10% здоровых пациентов в возрасте 65 лет могут иметься мутации в генах, связанные с наследственными синдромами, с предрасположенностью к ОМЛ/МДС. Таким образом, врачи должны избегать использования ПК, КМ или других тканей, контактирующих с ПК, таких как слюна, буккальные клетки. По мнению ряда экспертных групп, предпочтительным источником ДНК для обнаружения герминальной мутации у пациентов с острым лейкозом или МДС является ДНК из культивируемых фибробластов кожи, полученных с помощью 3-миллиметровой биопсии кожи или путем удаления кожного эллипса при проведении трепанобиопсии КМ. Основным недостатком использования культивируемых фибробластов кожи – период времени до 3–6 нед., необходимый для культивирования достаточного количества клеток для генетического тестирования, а также отсутствие технических возможностей для культивирования фибробластов кожи в ряде центров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы группа НТ превратилась в крайне гетерогенную категорию заболеваний, включающую синдромальные формы с поражением различных органов и тканей. С клинической точки зрения это подразумевает необходимость междисциплинарного подхода к ведению пациентов с НТ, принимая во внимание не только их склонность к кровотечениям, но и врожденные синдромальные расстройства и риск развития других заболеваний в будущем. Лучшее понимание механизма возникновения тромбоцитопении и других заболеваний дает уникальную возможность улучшить наши знания не только в области мегакариопоэза, но и в других медицинских областях, таких как злокачественная клональная пролиферация клеток крови, недостаточность костного мозга, поражение почек, слуха и зрения.

Важно отдельно выделить группу НТ с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям в связи с особенностями ведения таких пациентов в случае развития острого лейкоза или МДС. Врач-гематолог должен быть осведомлен о группе наследственных синдромов с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям и направлять всех пациентов с подозрительным семейным анамнезом, характерными синдромальными проявлениями для генетического консультирования и генетического исследования на

наличие герминальной мутации. Данные пациенты должны наблюдаться в центре, специализирующемся на ведении больных с наследственными формами острых лейкозов/МДС. Крайне важно, чтобы родственные совместимые доноры ГСК были тщательно оценены на наличие герминальной мутации, чтобы избежать потенциальной возможности вторичного развития гемобластоза у реципиента или повышения риска развития лейкоза у родственного донора из-за мобилизации стволовых клеток.

На сегодняшний день остается много вопросов, требующих дальнейших исследований. Крупные всесторонние исследования носителей герминальной мутации вне зависимости от инициального статуса КМ, включающие молекулярную характеристику до и во время клональной эволюции, позволят определить риск развития острого лейкоза, влияние соматических мутаций и эпигенетических aberrаций, а также факторов окружающей среды и других факторов, которые могут способствовать клональной эволюции и развитию острого лейкоза. Исследования в данной области позволят в конечном итоге разработать эффективные методы профилактики и алгоритмы ведения пациентов, аналогичные прогрессивным методикам лечения пациенток с наследственным раком молочной железы и яичников.

Активно обсуждаются следующие вопросы:

- идентификация новых генов, герминальные мутации в которых приводят к развитию НТ или к предрасположенности к гематологическим злокачественным новообразованиям;
- распространенность НТ и наследственных гематологических злокачественных новообразований в детской и взрослой популяциях;
- целесообразность инициального исследования на наличие герминальных мутаций у пациентов с острым лейкозом/МДС;
- оптимальный источник ДНК для определения герминальной мутации;
- роль профилактической аллогенной ТГСК, в частности, при развитии цитопении неясного значения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Erdomaeva Ya.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3810-1398>

Fedorova D.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

Zharkov P.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4384-6754>

Kurnikova M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0900-6874>

Mann S.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1014-5196>

Raykina E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7634-2053>

Литература

- Melazzini F., Zaninetti C., Balduini C.L. Bleeding is not the main clinical issue in many patients with inherited thrombocytopaenias. *Haemophilia* 2017; 23: 673–81.
- Zaninetti C., Santini V., Tiniakou M., Barozzi S., Savoia A., Pecci A. Inherited thrombocytopenia caused by ANKRD26 mutations misdiagnosed and treated as myelodysplastic syndrome: report on two cases. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 2388–92.
- Pecci A. Diagnosis and treatment of inherited thrombocytopenias. *Clin Genet* 2016; 89: 141–53.
- Noris P., Favier R., Alessi M., Geddis A.E., Kunishima S., Heller P.G., et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood* 2013; 122 (11): 1987–9.
- Balduini C.L., Pecci A., Noris P. Diagnosis and management of inherited thrombocytopenias. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39 (2): 161–71.
- Kitamura K., Yoshida K., Shiraishi Y., et al. Normal neutrophil myosin IIA localization in an immunofluorescence analysis can rule out MYH9 disorders. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2071–3.
- Gunz F.W., Gunz J.P., Veale A.M., Chapman C.J., Houston I.B. Familial leukaemia: a study of 909 families. *Scand J Haematol* 1975; 15 (2): 117–31.
- Song W.J., Sullivan M.G., Legare R.D., Hutchings S., Tan X., Kufrin D., et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999; 23 (2): 166–75.
- Бобрынина В.О., Баранова О.Ю., Самочатова Е.В., Масчан А.А. Семейная тромбоцитопения/тромбоцитопатия с предрасположенностью к развитию острого миелоидного лейкоза: описание новой семьи и мутации в гене *RUNX1*. *Онкогематология* 2011; 4: 6–11.
- Хаджиева Ф.Р., Жарков П.А., Федорова Д.В., Райкина Е.В., Игнатова А.А., Плясунова С.А. и др. Случай редкой наследственной тромбоцитопении с предрасположенностью к развитию острого миелоидного лейкоза у детей-близнецов. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 17 (4): 51–6.
- Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391–405.
- Balduini C.L., Melazzini F., Pecci A. Inherited thrombocytopenias – recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets* 2016; 28 (1): 3–13.
- Bluteau D., Balduini A., Balayn N., Currao M., Nurden P., Deswarte C., et al. Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest* 2014; 124: 580–91.
- de Graaf C.A., Metcalf D. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 2011; 10 (10): 1582–9.
- Wang D., Boerner S.A., Winkler J.D., Lorusso P.M. Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773 (8): 1248–55.
- Noris P., Perrotta S., Seri M., Pecci A., Gnan C., Loffredo G., et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood* 2011; 117: 6673–80.
- Noris P., Favier R., Alessi M.C., Geddis A.E., Kunishima S., Heller P.G., et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood* 2013; 122: 1987–9.
- Akpan I.J., Osman A.E.G., Drazer M.W., Godley L.A. Hereditary Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis, Questions, and Controversies. *Curr Hematol Malig Rep* 2018; 13: 426–34.
- Churpek J.E., Godley L.A. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood* 2016; 128: 1800–13.
- Rojek K., Nickels E., Neistadt B., Marquez R., Wickrema A., Artz A., et al. Identifying inherited and acquired genetic factors involved in poor stem cell mobilization and donor-derived malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 22 (11): 2100–3.
- Tawana K., Drazer M.W., Churpek J.E. Universal genetic testing for inherited susceptibility in children and adults with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: are we there yet? *Leukemia* 2018; 32 (7): 1482–92.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 10.02.2019

Принята к печати 10.06.2019

Семейный случай наследственной гемолитической анемии вследствие носительства аномального нестабильного гемоглобина с низкой аффинностью к кислороду (*Hb Cheverly*)

Е.Л. Кривошеина¹, Н.Ю. Коваль², Е.Н. Егорова¹, М.А. Горшкова¹,
Н.А. Карамян³, Е.А. Литвин³, С.Г. Манн³

¹ ГБОУ ВПО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь

² ГБУЗ Тверской области «Детская городская клиническая больница № 1», Тверь

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Контактная информация:
Кривошеина Елена Леонидовна,
профессор кафедры педиатрии
и неонатологии Тверского государственного
медицинского университета
Минздрава России.
Адрес: 170100, Тверь, ул. Советская, 4
E-mail: elk1941@yandex.ru

Наследственные гемолитические анемии вследствие нестабильного гемоглобина – редкая и малоизученная патология, характеризующаяся вариабельностью клинических проявлений. Для данного заболевания характерно развитие гемолитических кризов на фоне провоцирующего фактора – респираторной инфекции, приема лекарственных препаратов, вызывающих гемолиз. Возраст дебюта зависит от того, в какой из глобиновых цепей происходит замена. В особую группу среди данных заболеваний можно вынести гемолитические анемии, ассоциированные с наличием в эритроцитах структурно аномального нестабильного варианта гемоглобина с низкой аффинностью к кислороду. При этом типе аномального гемоглобина пульсоксиметрия демонстрирует ложно низкие показатели кислородного насыщения крови при повышенной доставке кислорода к тканям. Идентификация гемоглобина важна во избежание неправильной интерпретации низкого кислородного насыщения при пульсоксиметрии в неотложных ситуациях – во время операции, при проведении интенсивной терапии. В статье представлены анализ семейного случая наследственной гемолитической анемии вследствие нестабильного гемоглобина *Cheverly* с описанием основных диагностических этапов, а также разнообразие клинических проявлений данного заболевания. Родители пациента дали согласие на использование информации о ребенке в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: нестабильный гемоглобин, низкая аффинность к кислороду, наследственная гемолитическая анемия, *Hb Cheverly*, семейный случай

Кривошеина Е.Л. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 62–69.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-62-69

© 2019 by NMRC PHOI

Received 10.02.2019

Accepted 10.06.2019

Family case hemolytic anemia due to abnormal unstable hemoglobin with low oxygen affinity (*Hb Cheverly*)

E.L. Krivosheina¹, N.Yu. Koval², E.N. Egorova¹, M.A. Gorshkova¹, N.A. Karamyan³, E.A. Litvin³, S.G. Mann³

¹ Tver State medical University of the Ministry of Health of Russia, Tver

² City Clinical children's Hospital №1, Tver

³ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Hereditary hemolytic anemia caused by unstable hemoglobin is a rare pathology, characterized by variability of clinical manifestations. This disease is characterized by the hemolytic crises, which are frequently associated with infections or taking drugs that cause hemolysis. Age of debut depends on which of the globin chains mutation occurs. Among these diseases, hemolytic anemia associated with the presence of a structurally abnormal unstable hemoglobin with low oxygen affinity in the erythrocytes is a special group. With this type of abnormal hemoglobin, pulse oximetry demonstrates falsely low oxygen saturation of the blood, with increased oxygen delivery to the tissues. It is important to identify unstable hemoglobin in order to avoid the misinterpretation of low oxygen saturation during the pulse oximetry in emergency cases, surgeries or intensive therapy. The article presents an analysis of the family with hereditary hemolytic anemia due to unstable hemoglobin *Cheverly*. The main clinical and diagnostic markers of the disease are described in detail. Parents gave their permission for using personal data for clinical research and publications.

Key words: unstable hemoglobin, low affinity to oxygen, hereditary hemolytic anemia, hemoglobin *Cheverly*, family case

Krivosheina E.L., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 62–69.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-62-69

Correspondence:
Elena L. Krivosheina, MD, DSc,
Professor, Department of pediatrics
and neonatology Tver State medical
University of the Ministry of Health
of Russia.
Address: Russia 170100, Tver,
Sovetskaya st., 4
E-mail: elk1941@yandex.ru

Наследственные гемолитические анемии, связанные с носительством нестабильного гемоглобина (НГ), – это редко встречающаяся патология, относящаяся к наследственным несфероцитарным гемолитическим анемиям с ауто-сомно-доминантным типом наследования. На сегодняшний день описаны только гетерозиготы с НГ, кроме того, в 1/3 случаев это заболевание – результат спонтанных мутаций.

Анемия у пациентов из данной группы ассоциирована с наличием аномального гемоглобина в эритроцитах [1], неустойчивого к различным факторам внешней среды (нагревание, окисляющие факторы и др.). При этом в большинстве случаев мутация затрагивает бета-глобиновую цепь, реже – альфа-глобиновую. Кроме того, описаны варианты гемоглобинов, появление которых связано с изменениями в цепях гамма- и дельта-глобина. Всего за последние 60 лет было описано более 1200 различных мутаций глобиновых генов, связанных с появлением новых вариантов строения гемоглобина [2]. Многие из них не приводят к значительным биохимическим и функциональным нарушениям, однако в других случаях замены могут вызывать нестабильность белка, а также нарушение сродства к кислороду, проявляющееся как повышением, так и понижением аффинности. Описано около 150 вариантов гемоглобинопатий, связанных с наличием нестабильного гемоглобина [3].

Клиническая картина зависит от того, в каком именно участке молекулы гемоглобина произошло нарушение структуры, а также от индивидуальных особенностей организма, так как даже в рамках одной семьи течение заболевания может варьировать от тяжелых форм с гемолитическими кризами либо цианоза, связанного с повышенным образованием метгемоглобина, до бессимптомного носительства. В большинстве случаев гемолиз у пациентов с нестабильным гемоглобином хорошо компенсирован и редко имеет хронический характер, а некоторые НГ *in vivo* не имеют клинических признаков гемолиза. У таких пациентов практически всегда триггером развития гемолитического криза становится либо инфекционный эпизод с подъемом температуры, либо прием лекарственных препаратов, обладающих высоким окислительным потенциалом (нестероидные противовоспалительные средства, сульфаниламиды, нитрофураны и др.). При наличии аномальной бета-глобиновой цепи характерен дебют заболевания в возрасте старше 6 мес., после замены HbF на HbA. В случае более ранней презентации дефект, как правило, обнаруживают в альфа- или гамма-глобиновой цепи. При этом у части НГ со стертым клиническим течением одним из основных признаков заболевания является

изменение сродства гемоглобина к O₂ [1, 4]. Чаще встречается носительство НГ, сопровождающееся повышением аффинности к O₂, иногда – повышением содержания гемоглобина. Описаны также случаи наследственных гемолитических анемий, связанных с наличием нестабильного гемоглобина и многообразием клинических проявлений, таких как снижение сродства к кислороду, анемия, цианоз и хронический гемолиз с периодическим появлением темной мочи [5, 6]. Понижение аффинности гемоглобина к O₂ описано для таких нестабильных гемоглобинов, как *Hb Southampton (Casper) O6 (G8) Leu→Pro*, *Hb Moscva (β24 Gly→Asn)*, *Hb Hammersmith (β42(CD1) Phe→Ser)* и *Hb Cheverly (α2β245(CD4) (CD4) Phe→Ser)* [4–6].

В случае более легкой формы заболевания при физикальном осмотре возможно отсутствие фенотипических изменений, а снижение сатурации кислорода отмечают только при развитии анемии 1-й степени [7]. При более тяжелых формах, характеризующихся развитием гемолитических кризов у пациентов на фоне снижения содержания гемоглобина, или у пациентов с хроническим течением гемолиза возможно постоянное снижение сатурации O₂. Вариабельность клинических проявлений при наличии наследственной гемолитической анемии, связанной с НГ, а также часто встречающееся отсутствие специфических изменений при проведении стандартных лабораторных исследований затрудняют диагностику данной патологии.

При обследовании пациентов важно измерение сатурации O₂ крови стандартным (чрескожным) методом – пульсоксиметрией [5, 6, 8–10]. При нестабильности аномального гемоглобина за счет его структуры, поглощающей большее количество инфракрасного света, показания прибора искажаются, и пульсоксиметрия дает ложно низкие результаты при измерении кислородного насыщения крови. В этом случае наиболее информативен для диагностики показатель P₅₀ (давление O₂, при котором им насыщено 50% гемоглобина, выражает степень его сродства к O₂) [5, 6].

В случае *Hb Cheverly (α2β245(CD4) (CD4) Phe→Ser)* происходит точечная мутация во втором нуклеотиде 45 кодона бета-глобиновой цепи, что ведет к замене фенилаланина на серин, вызывая нарушение связи между гемом и глобином, приводя к нестабильности всей молекулы гемоглобина. *Hb Cheverly* – один из редко встречающихся нестабильных аномальных гемоглобинов. Согласно опубликованным данным, в Германии за 40 лет зарегистрированы 9 пациентов с *Hb Cheverly* [11], зарегистрированы также единичные случаи в Америке [12–14]. Похожая мутация характерна для *Hb Hammersmith (β42(CD1) Phe→Ser)*,

ассоциированного с более тяжелым течением гемолитической анемии.

У пациентов с *Hb Cheverly* клиническая картина, как правило, характеризуется достаточно мягким течением. В некоторых из описанных случаев диагноз был установлен пациентам без каких-либо проявлений гемолитической анемии, после выявления низкой сатурации O_2 при проведении пульсоксиметрии перед плановым оперативным вмешательством [13]. При этом отсутствовала корреляция между данными пульсоксиметрии, демонстрировавшей снижение сатурации O_2 до 70–90%, и отсутствием клиники гипоксемии, а также данными исследования газов крови, показывающими нормальные значения парциального давления O_2 и насыщение гемоглобина кислородом в артериальной крови. У других пациентов отмечали нормохромную, нормоцитарную анемию 1–2-й степени, сопровождавшуюся незначительным ретикулоцитозом без признаков гемолиза, по данным биохимического анализа сыворотки крови. Кроме того, электрофорез фракций гемоглобина на ацетате целлюлозы и цитратном агаре не выявлял аномальной фракции [12, 14]. Для обнаружения аномального гемоглобина требовалось проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующим определением последовательности нуклеотидов глобиновых генов методом секвенирования [5, 6, 8].

Несмотря на то что в литературе описаны три случая хорошего ответа взрослых пациентов с НГ на терапию гидроксимочевинной с целью медикаментозной стимуляции синтеза HbF, сведений о положительном опыте подобной терапии у детей до последнего времени не существовало. Первые данные об эффективности экспериментальной терапии гидроксикарбамидом у пациентов младшего возраста появились в 2016 году [15]: хорошего ответа удалось добиться у одного из двух пациентов в возрасте до 10 лет. К сожалению, малая выборка пациентов пока не позволяет оценить перспективы терапии гидроксимочевинной у пациентов с НГ. Кроме того, некоторое положительное действие при наличии НГ могут оказывать антиоксидантные препараты. Описаны также случаи снижения интенсивности гемолиза на фоне терапии рибофлавином или флавинадениндинуклеотидом [4].

Под нашим наблюдением находится ребенок с гемоглобинопатией *Cheverly*; по результатам обследования был подтвержден семейный случай гемолитической анемии, связанной с носительством нестабильного гемоглобина. Мы приводим описание данного клинического случая с согласия всех членов семьи, учитывая редкость данной патологии, трудности диагностического поиска, а также более тяжелое течение заболевания у нашего пациента по

сравнению с клиническими случаями, описанными в зарубежных публикациях.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Мальчик Н., от 3-й беременности (1-я – медицинский аборт; 2-я – замершая на сроке 2 нед.), протекавшей с токсокозом, тремя угрозами прерывания, выявленным у матери гепатитом С на 2-м мес. гестации; от первых оперативных родов (кесарево сечение на 39-й нед.) с натальной травмой шейного отдела позвоночника. При рождении масса тела ребенка – 3790 г, длина тела – 54 см; оценка по шкале Апгар – 8/9 баллов. Ребенок с рождения находился на искусственном вскармливании. Учитывая наличие у матери гепатита С, мальчик находился под наблюдением: ПЦР-диагностику крови на наличие РНК гепатита С провели на 1-м и 2-м мес. жизни (дважды был получен отрицательный результат). По данным биохимического исследования крови в 3 мес.: активность печеночных трансаминаз и концентрация билирубина в сыворотке крови – в пределах нормальных значений. Раннее развитие ребенка соответствовало возрасту.

Из семейного анамнеза известно, что у матери пациента в возрасте 1 года после перенесенной респираторной инфекции была отмечена гемолитическая анемия; повторных эпизодов гемолиза в течение жизни не было.

В возрасте 10 мес. жизни пациент был госпитализирован в Центральную районную больницу г. Ржева с жалобами на повышение температуры тела до субфебрильных цифр, слабость, а также дисфункцию кишечника после погрешности в питании. При обследовании у мальчика выявили тяжелую анемию (Hb – 66 г/л; RBC – $2,3 \times 10^{12}/л$), азотемию. При микробиологическом исследовании кала данных за наличие бактериальной инфекции не получено. На 3-и сутки пациент был переведен в Детскую областную клиническую больницу г. Твери с направляющим диагнозом: гемолитико-уремический синдром, гипохромная анемия тяжелой степени. При поступлении у ребенка отмечены: артериальная гипертензия (АД – до 137/105 мм рт. ст.), олигурия и макрогематурия, азотемия (увеличение содержания мочевины и креатинина в сыворотке крови до 3 норм), ретикулоцитоз (270‰), тромбоцитопения (число тромбоцитов снижено до $58 \times 10^9/л$). Анализ крови на прямую и непрямую реакцию Кумбса – отрицательный. По данным УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства у ребенка выявлена гепатоспленомегалия и диффузные изменения паренхимы почек. При повторном УЗИ отмечены появление отека почек и увеличение их размера, асцит.

На фоне проводимой терапии – инфузионной, антибактериальной, заместительных трансфузий эритроцитарной массы с индивидуальным подбором донора (№ 2), трансфузий свежезамороженной плазмы (№ 4), глюкокортикостероидов (парентерально в течение 3 дней), симптоматической терапии – состояние ребенка без динамики. Пациент был переведен в Российскую детскую клиническую больницу (РДКБ), Москва, 29.01.2015: консилиум врачей диагностировал атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС). Мальчику в течение 23 дней проводили перитонеальный диализ.

С 06.02.2015 ребенку была инициирована терапия экулизумабом – моноклональным антителом, представляющим собой ингибитор терминальных комплексов системы комплемента. Применение этого препарата позволяет остановить тромбообразование в сосудах микроциркуляторного русла [16].

На фоне проводимой терапии была достигнута стабилизация состояния. При дальнейшем обследовании пациента в ходе молекулярно-генетического исследования методом секвенирования патогенные мутации в генах *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *THBD*, ответственных за синтез белков-регуляторов комплемента, не выявлены; обнаружен полиморфизм гена *CFH*. Согласно медицинским базам данных [17], наличие полиморфизма в гене фактора комплемента Н может быть ассоциировано с макулярной дегенерацией сетчатки; данных за развитие аГУС у таких пациентов на сегодняшний день нет.

Ребенка выписали из отделения нефрологии РДКБ, Москва, 20.03.2015 под наблюдение нефролога в Твери. Продолжена терапия в режиме:

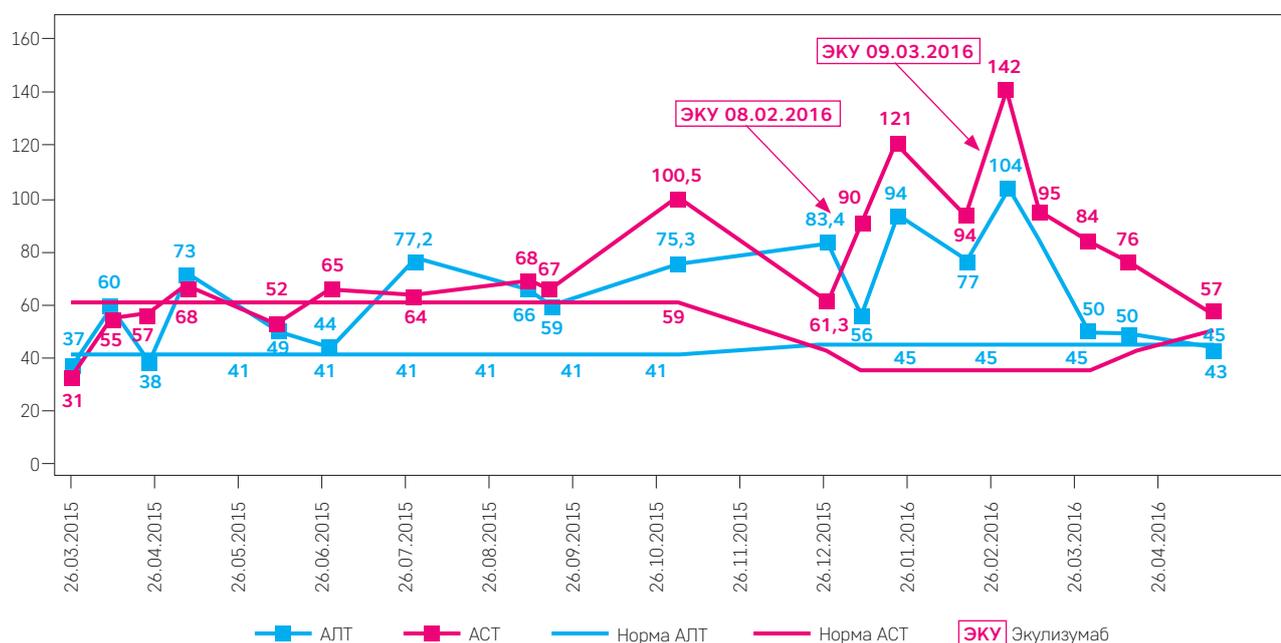
парентеральное введение экулизумаба, 1 раз в 2 нед.; симптоматическая терапия (дипиридамол, эналоприл, L-карнитин, веторон, железа (III) гидроксид полимальтозный комплекс). На фоне проводимой терапии в гемограмме периодически отмечали анемию легкой степени (97–119 г/л); количество ретикулоцитов несколько повышено (16–18%), остальные показатели в пределах референсных значений.

С апреля 2015 года в контрольных биохимических анализах крови наблюдалось эпизодическое повышение активности печеночных трансаминаз в сыворотке крови при отрицательных результатах серологического исследования на вирусные гепатиты и внутриутробные инфекции, что расценили как холестатический синдром. В августе 2015 года к терапии добавили урсодезоксихолевую кислоту сроком на 3 мес. В январе 2016 года повышение активности аспарагиновой и аланиновой трансаминаз достигло 4 и 2,5 норм соответственно; концентрация ферритина сыворотки – более 700 нг/мл; отмечено увеличение размера печени. По данным эластографии, жесткость печени не была изменена. Интервал между инфузиями экулизумаба увеличили до 4 нед.; к терапии добавили гепатопротекторы: на этом фоне размер печени сократился, однако повышение активности трансаминаз сохранялось.

Учитывая нарастание активности трансаминаз после введений экулизумаба (рисунк 1), с 09.03.2016 таргетная терапия была приостановлена из-за угрозы развития фиброза и цирроза печени; на этом фоне активность печеночных трансаминаз постепенно нормализовалась; содержание ферритина сыворотки снизилось до 134,9 нг/мл.

Рисунок 1

Динамика активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) на фоне лечения экулизумабом



По результатам планового обследования в РДКБ, Москва, функция почек не нарушена. По данным эластографии печени от 19.05.2016: фиброз печени – F1 по METAVIR. По результатам УЗИ органов брюшной полости: УЗ-признаки уплотнения сосудов и желчных протоков печени. Через 6 мес. (24.11.2016) выполнен контроль эластографии печени: F0 по METAVIR; жесткость печени не изменена (10 результатов при измерении эластичности колебались в пределах от 3,0 до 7,1 Кпа; медиана – 4,2 Кпа); достоверность – 83%. Далее ребенок находился под наблюдением педиатра, повторных гемолитических кризов не было, состояние оставалось стабильным.

В возрасте 2 лет, в период реконвалесценции, после внебольничной очаговой пневмонии, у мальчика впервые было выявлено снижение сатурации O₂ крови – до 80%. С учетом полученных данных, а также того, что при первичном обследовании не обнаружены мутации в генах, вызывающих развитие аГУС, было проведено дообследование с целью

окончательной верификации диагноза. При физикальном обследовании у пациента отметили неустойчивый легкий цианотичный оттенок кожных покровов в области носогубного треугольника. В общем анализе крови: количество эритроцитов – $3,90 \times 10^{12}/л$; Hb – 105 г/л; гематокрит – 29,18%; средний объем эритроцита (MCV) – 75 фл; среднее содержание Hb в эритроците (MCH) – 27,0 пг; средняя концентрация Hb в эритроците (MCHC) – 360 г/л; ширина распределения эритроцитов (RDW) – 14,3%; число лейкоцитов – $7,5 \times 10^9/л$; количество тромбоцитов – $272 \times 10^9/л$; относительное содержание ретикулоцитов – 18‰; СОЭ – 3 мм/ч; умеренный анизоцитоз. Содержание эритропоэтина в сыворотке крови – в пределах нормальных значений (24,6 мМЕ/мл). Концентрация метгемоглобина в крови – 2,87% (норма – не более 3%).

Биохимический анализ крови: непрямой билирубин – 17 мкмоль/л; АЛТ – 30 Ед/л; АСТ – 34 Ед/л; тимоловая проба – 1,3 ед.; ЩФ – 542 Ед/л.

Таблица

Результаты обследования семьи пациента

Показатель	Ребенок, 3 года	Мать	Дедушка	Референтные значения
Пульсоксиметрия, %	76–81	73–86	74,3–80	
Общий анализ крови				
Hb, г/л	105	110	125	115–138
Гематокрит, %	29,18	30,75	34,53	31–40
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	3,9	3,59	3,99	4,2–4,6
MCV, фл	75	86	87	75–100
MCH, пг	27	30,6	31,3	25–33
MCHC, г/л	360	357	362	322–368
RDW-CV, %	14,3	13,7	14,8	11–16
Ретикулоциты, ‰	18	16	18	< 10
Анизоцитоз	+	+	–	–
Кислотно-основное состояние				
pH	7,365	7,403	Норма	
pO ₂ , мм рт. ст.	92,6	97,5	83,9	83,0–108,0
pCO ₂ , мм рт. ст.	34,6	38,5	Норма	
Лактат, ммоль/л	Норма	1,9	Норма	
Электрофорез гемоглобина				
HbA ₂ , %	3,1	3,0	3,0	2–3
HbF, %	1,0	–	–	< 1
Z1 zone	Едва выявляемая	0,2	0,2	Нет
Стабильность Hb				
Тест с n-бутанолом	+	+	+	Отрицательный
Высокоэффективная жидкостная хроматография				
Аномальная бета-глобиновая цепь, %	4,01	4,1	3,48	Нет
Сродство Hb к кислороду				
P50 (при t 36,6 °C)	38,55	33,88	35,16	28,85

Рисунок 2

Электрофорез фракций гемоглобина семьи: **А** – пациент, **Б** – мать пациента, **В** – дедушка пациента

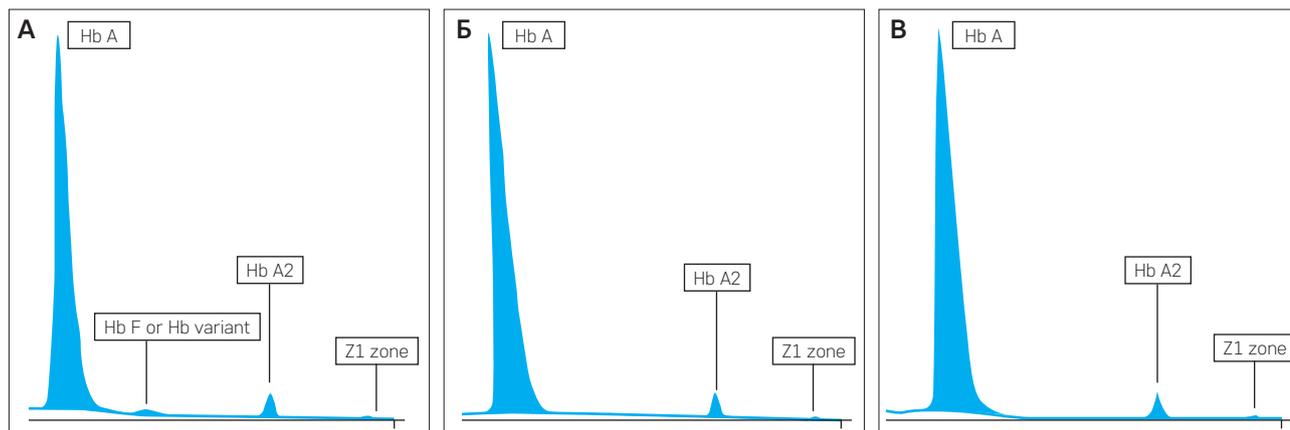


Рисунок 3

Анализ структуры цепей гемоглобина:

А – пациент, **Б** – мать пациента, **В** – дедушка пациента

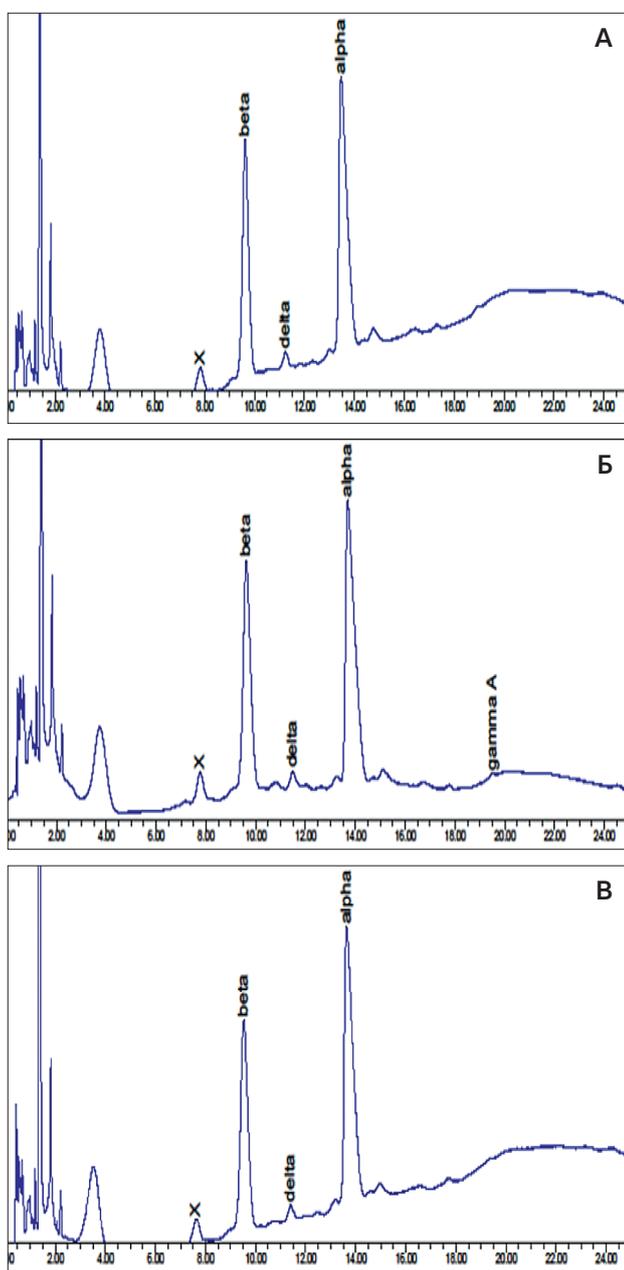
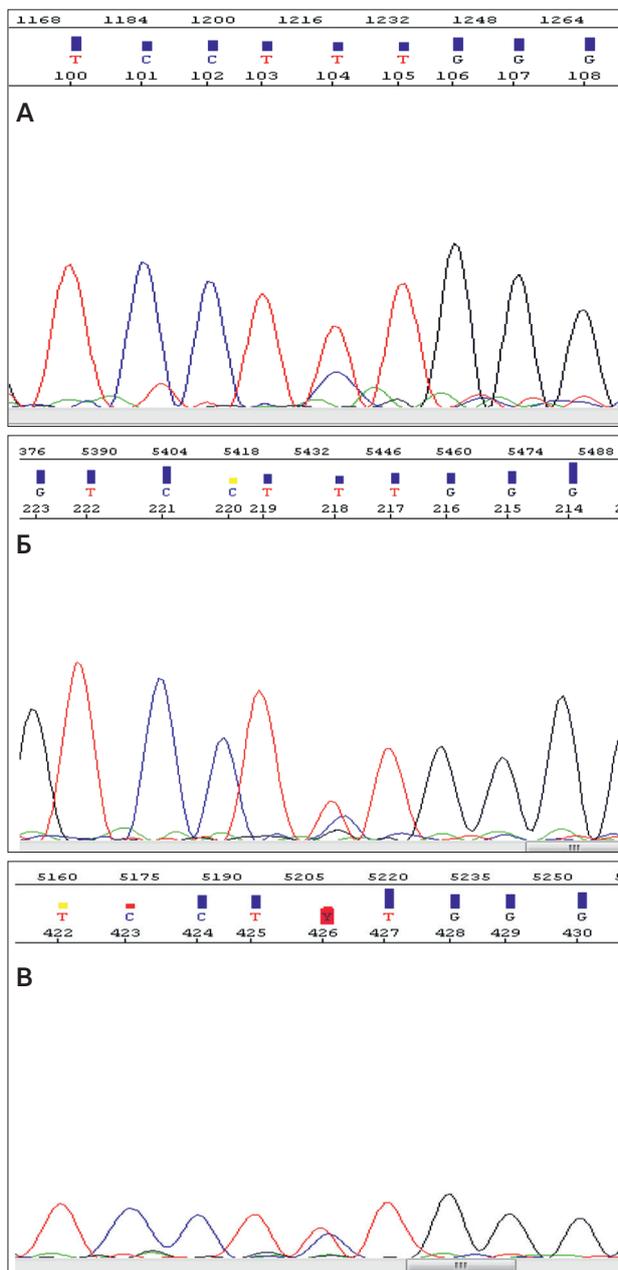


Рисунок 4

Результаты секвенирования семьи:

А – пробанд; **Б** – мать пробанда; **В** – дедушка пробанда



Проведено исследование кислотно-основного состояния капиллярной крови: газовый состав крови компенсирован; выявлена умеренная гипокапния: $p\text{CO}_2$ – 34,6 мм рт. ст. (референтные значения – 35,0–48,0 мм рт. ст.); $p\text{H}$ – 7,365; $p\text{O}_2$ – 80,9 мм рт. ст. (референтные значения – 83,0–108,0 мм рт. ст.). Электролитный состав и показатели системного метаболизма (лактат, глюкоза) – в пределах нормальных значений.

По данным инструментальной диагностики (ЭКГ, ЭХО-КГ) патологии не выявлено.

Были обследованы также члены семьи мальчика: мать (28 лет, главный менеджер отдела транспорта) и бабушка по материнской линии (53 года, водитель маршрутного такси, курит). При сборе анамнеза выяснено, что у матери в 2014 году, во время родов, отмечена низкая сатурация O_2 , а в раннем детстве произошел однократный гемолитический криз. У бабушки также обнаружили низкую сатурацию O_2 , что было подтверждено в дальнейшем. Результаты обследования семьи представлены в таблице.

Всем членам семьи выполнены электрофорез фракций гемоглобина, хроматографическое исследование глобиновых цепей и молекулярно-генетический анализ последовательности глобиновых генов. У всех членов семьи выявлена патологическая фракция Hb (рисунки 2). Для оценки стабильности гемоглобина был выполнен тест с *n*-бутанолом, продемонстрировавший положительный результат у всей трех членов семьи.

Для дальнейшей верификации аномальной фракции гемоглобина был проведен анализ цепей Hb с помощью ВЖЭХ (рисунки 3) по методике, описанной *H. Nemati* с соавт. [18]. В образце крови больного выявлена аномальная бета-глобиновая цепь (β^*) – 4,01%; у матери пациента – 4,1%; у бабушки – 3,48%.

Для уточнения характера аномалии выполнено молекулярно-генетическое исследование. При поиске наиболее частых делеций с вовлечением генов альфа-глобинов методом ПЦР, а также при анализе методом прямого секвенирования стоп-кодонов и сигнальных последовательностей полиаденилирования генов альфа-глобина HBA1 и HBA2 мутации не обнаружены.

При анализе последовательности бета-глобинового гена методом прямого секвенирования получены идентичные результаты у пробанда и его родственников – выявлена мутация в бета-глобиновом гене *CD45*: T > C (TTT > TCT) в гетерозиготном состоянии (рисунки 4). В результате данной мутации происходит замена аминокислоты фенилаланин на серин, что приводит к формированию аномального нестабильного гемоглобина *Hb Cheverly*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наследственные гемолитические анемии, связанные с нестабильным гемоглобином, – это малоизученная группа заболеваний, диагностика которых затруднена как в связи с отсутствием настороженности по отношению к данной патологии, так и с труднодоступностью и высокой стоимостью необходимых исследований на территории России. Поводом расширить круг дифференциальных диагнозов у пациента до обследования на НГ может служить выраженная гипохромия и несоответствие степени ретикулоцитоза тяжести анемии [4, 7]. А повышенный показатель P_{50} , в свою очередь, наиболее убедителен для диагностики низкой аффинности к O_2 .

Наличие НГ с низкой аффинностью к O_2 вне гемолитического криза не требует никакого лечения. Ранняя диагностика важна, поскольку позволяет избежать дополнительных обследований пациента и его семьи, исключить из употребления продукты/препараты – провокаторы гемолиза, не проводить избыточную симптоматическую терапию [5, 6]. У пациента с НГ и низкой аффинностью к O_2 низкое кислородное насыщение при пульсоксиметрии может быть неправильно интерпретировано при неотложном состоянии, во время операции или интенсивной терапии, поэтому ранняя диагностика гемолитической анемии вследствие нестабильного гемоглобина имеет первостепенное значение.

Описанный клинический случай демонстрирует семейный вариант редкой патологии эритроцитов, сопровождающейся гемолитической анемией. Характерная особенность анемий, связанных с наличием нестабильного гемоглобина, – варибельность клинической картины даже в рамках одной семьи: от бессимптомного носительства у бабушки пациента до тяжелого гемолитического криза в возрасте до 1 года у самого ребенка.

Учитывая ранний дебют заболевания у пациента, тяжесть гемолитического криза, сопровождавшегося острым повреждением почек и потребовавшего проведения перитонеального диализа, длительной терапии моноклональным антителом – экулизумабом с целью достижения ремиссии, сохраняющейся более 2,5 года, а также изменения при проведении пульсоксиметрии (с 2-летнего возраста) при общем удовлетворительном состоянии ребенка и отсутствии данных за наличие патологии сердечно-сосудистой и дыхательной систем, было проведено дополнительное обследование пациента в федеральном Центре. По результатам обследования (анемия легкой степени, наличие патологической фракции гемоглобина, а также результаты

молекулярно-генетического исследования) пациенту был установлен диагноз: наследственная гемолитическая анемия, вызванная нестабильным гемоглобином *Cheverly*. Данные обследования проба и его родственников подтверждают семейный случай носительства аномального НГ с низкой аффинностью к O_2 .

Особенности генеалогического анамнеза описанного пациента (отсутствие гемолитических кризов у бабушки, единственный гемолитический криз в раннем возрасте у матери ребенка без рецидивов до настоящего времени) и полное восстановление функции почек позволяют надеяться на благоприятную динамику состояния ребенка. На данный момент в течение более чем 2,5 года не зафиксировано повторных гемолитических кризов (срок с момента отмены терапии экулизумабом – более 1,5 года). Однако пациент требует тщательного наблюдения в связи с перенесенной тромботической

микроангиопатией (на фоне гемолитического криза, обусловленного содержанием в эритроцитах НГ со сниженной аффинностью к O_2) и возникновением преходящего фиброза печени 1-й степени после реактивного гепатита лекарственной этиологии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Krivosheina E.L. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2640-9878>

Krivosheina E.L. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2640-9878>

Koval N.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5679-3869>

Egorova E.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4323-5286>

Gorshkova M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1762-9705>

Karamyan N.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9865-527X>

Litvin E.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6331-5339>

Mann S.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1014-5196>

Литература

- Папаян А.В., Жукова Л.Ю. Анемии у детей: руководство для врачей. – СПб.: Питер, 2001. – 384 с.
- Christopher S.T., Claire F.D., David A.G., Mitchell J.W. Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013 Mar 1; 3 (3): a 011858.
- Edward H.L., Pisani L.A., Rodriguez-Romero W.E., Chaves-Villalobos J., Garcia-Quesada J., Harris N.S., et al. Hb Youngstown [β 101(G3)Glu \rightarrow Ala; HBB: c.305A > C]: An unstable hemoglobin variant causing severe hemolytic anemia. *Hemoglobin* 2014; 38: 381–4.
- Гемоглинопатии и талассемические синдромы / Под ред. А.Г. Румянцев, Ю.Н. Токарева, Н.С. Сметаниной. – М.: Практическая медицина, 2015. – 448 с.
- Zur B., Mayer-Hubner B., Ludwig M., Stoffel-Wagner B. A 14-year-old boy with chronic cyanosis, mild anemia, and limited physical resistance to stress. *Clin Chem* 2012; 58 (4): 332–6.
- Steinberg M.H., Nagel R.L. Unstable hemoglobins, hemoglobins with altered oxygen affinity, hemoglobin M and other variants of clinical and biological interest. In: Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Weatherall D.J., eds. *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press; 2009, p. 589–606.
- Финогенова Н.А., Чернов В.М., Морщакова Е.Ф., Павлов А.Д., Ковригина Е.С., Кузнецова Ю.В. и др. Анемии у детей: диагностика, дифференциальная диагностика, лечение: Пособие для врачей-педиатров и гематологов. – М.: МАКС Пресс, 2004, 216 с.
- Zur B., Hornung A., Breuer J., Doll U., Bernhardt C., Ludwig M., Stoffel-Wagner B. A novel hemoglobin, Bonn, causes falsely decreased oxygen saturation measurements in pulse oximetry. *Clin Chem* 2008; 54 (3): 594–6.
- Agarwal N., Nagel R.L., Prchal J.T. Dyshemoglobinemias. In: Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Weatherall D.J., eds. *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press; 2009, p. 607–22.
- Verhovsek M., Henderson M.P.A., Cox G., Luo H.Y., Steinberg M.H., Chui D.N.K. Unexpectedly low pulse oximetry measurements associated with variant hemoglobin: a systematic review. *Am J Hematol* 2010; 85: 882–5.
- Kohne E., Kleihauer E. Hemoglobinopathies: a longitudinal study over four decades. *Dtsch Arztebl Int* 2010 Feb; 107 (5): 65–71. Doi: 10.3238/arztebl.2010.0065
- Yeager A.M., Zinkham W.H., Jue D.L., Winslow R.M., Johnson M.H., McGuffey J.E., Moo-Penn W.F. Hemoglobin Cheverly: an unstable hemoglobin associated with chronic mild anemia. *Pediatr Res* 1983 Jun; 17 (6): 503–7.
- Yodfat U.A., Vaida S.J. Unexpected falsely low pulse oximeter measurements in a child with hemoglobin Cheverly. *Anesth Analg* 2006 Jul; 103 (1): 259–60.
- Hohl R.J., Sherburne A.R., Feeley J.E., Huisman T.H., Burns C.P. Low pulse oximeter-measured hemoglobin oxygen saturations with hemoglobin Cheverly. *Am J Hematol* 1998 Nov; 59 (3): 181–4.
- Loovers H.M., Tamminga N., Mulder A.B., Tamminga R.Y. Clinical Course of Two Children with Unstable Hemoglobins: The Effect of Hydroxyurea Therapy. *Hemoglobin* 2016 Sep; 40 (5): 341–4. Epub 2016 Sep 30.
- Клинические рекомендации по диагностике и лечению атипичного гемолитико-уремического синдрома. Научное общество нефрологов России. *Нефрология и диализ* 2015; 17 (3): 242–64.
- <https://www.omim.org/entry/603075>
- Nemati H., Bahrami G., Rahimi Z. Rapid separation of human globin chains in normal and thalassemia patients by RP-HPLC. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 3213–8.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 07.09.2018

Принята к печати 11.02.2019

Витамин В12-дефицитная анемия у детей грудного возраста: клиническая картина, современные методы диагностики и лечения

М.А. Луныкова¹, В.Г. Демихов¹, С.Н. Дронова², Ю.Ю. Калинина³, О.Н. Журнина¹

¹ Научно-клинический центр гематологии, онкологии и иммунологии
ФГБ ОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань

² ГБУ Рязанской области «Областная детская клиническая больница им. Н.В. Дмитриевой», Рязань

³ ГБУ Рязанской области «Городская клиническая больница № 11», Рязань

Контактная информация:

Демихов Валерий Григорьевич,
доктор мед. наук, профессор,
директор научно-клинического
центра гематологии, онкологии и
иммунологии Рязанского государ-
ственного медицинского универ-
ситета им. академика И.П. Павлова
Минздрава России.
Адрес: 390029, Рязань,
ул. Строителей, 5-в
E-mail: demix777@ya.ru

Дефицит витамина В12 (кобаламина) у детей, находящихся исключительно на грудном вскармливании, – обычно результат его дефицита у матерей (вегетарианки, с нераспознанной пернициозной анемией или синдромом мальабсорбции). Кобаламин имеет решающее значение для нормального развития нервной системы, производства эритроцитов и синтеза ДНК. Классическое проявление его дефицита – мегалобластная анемия, в продвинутых ее стадиях – панцитопения. Однако у маленьких детей превалирует неврологическая симптоматика (регресс навыков развития, летаргия, двигательные расстройства) как следствие неадекватной миелинизации головного мозга. На фоне терапии кобаламином у большинства детей неврологическая симптоматика регрессирует, однако может сохраняться неврологический дефицит разной выраженности. Долгосрочный прогноз зависит от длительности дефицита витамина В12. В статье приведены собственные интересные клинические наблюдения. Родители пациентов дали согласие на использование информации о ребенке в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: анемия, дефицит витамина В12, грудные дети, атрофия мозга

Луныкова М.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 70–77.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-70-77

© 2019 by NMRC PHOI

Received 07.09.2018

Accepted 11.02.2019

Vitamin B12-deficiency anemia in infants: clinical presentation, current diagnostic and treatment

М.А. Lunyakova¹, V.G. Demikhov¹, S.N. Dronova², Yu.Yu. Kalinina³, O.N. Zhurina¹

¹ Reserch center for hematology, oncology and immunology of Rязan state medical university named after academician I.P. Pavlov, Rязan

² N. Dmitrieva Rязan Regional Clinical Children's Hospital, Rязan

³ Rязan City Clinical Hospital № 11, Rязan

Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in infants exclusively breastfed is usually the result of its deficiency in the mothers (vegetarians or in the presence of unrecognized pernicious anemia or malabsorption syndrome). Cobalamin is crucial for the normal development of the nervous system, the production of erythrocytes and the synthesis of DNA. The classic manifestation of its deficiency is megaloblastic anemia and, in advanced cases, pancytopenia. However, infants often present neurological symptoms (fatigue, failure to thrive, regress of developmental skills, lethargy, motor disorders), as a consequence of inadequate myelination of the brain. Cobalamin treatment is effective in the most children, however, the neurological deficit varying degrees may persist. The long-term prognosis depends on overall duration of vitamin B12 deficiency and severity of symptoms. The article presents our own interesting clinical observations. Parents gave their permission for using personal data for clinical research and publications.

Key words: anemia, vitamin B12 deficiency, infants, brain atrophy

Lunyakova M.A., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 70–77.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-70-77

Дефицит витамина В12 (кобаламина) у грудных детей обычно является результатом его дефицита у матери – это младенцы, находящиеся исключительно на грудном вскармливании у матерей-вегетарианок или матерей с не распознанной ранее пернициозной анемией, что приводит к недостаточному количеству витамина в грудном молоке и низким запасам витамина В12 при рождении. Гораздо реже наблюдаются наследственный дефицит транскобаламина II, врожденные нарушения метаболизма кобаламина и др. [1].

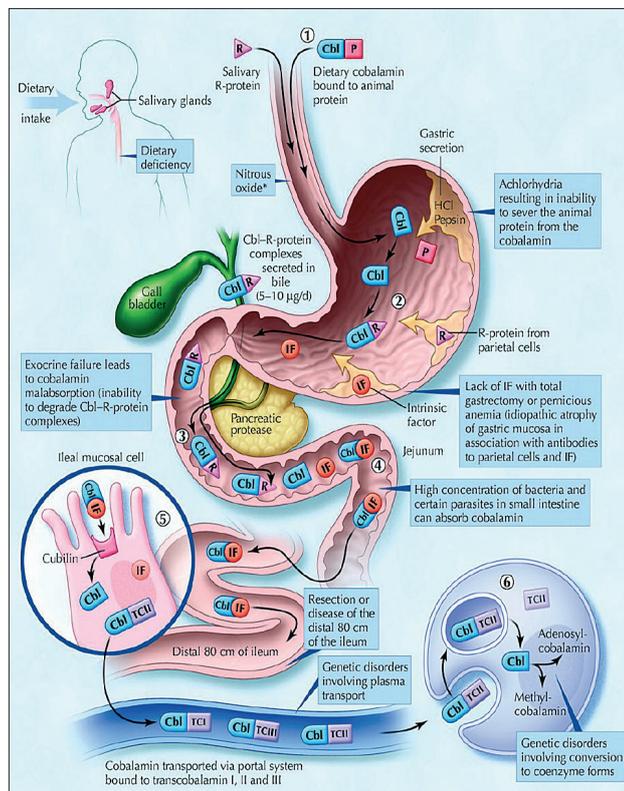
Метаболизм витамина В12. Витамин В12 водорастворим, он имеет решающее значение для нормальной функции нервной системы, производства эритроцитов и синтеза ДНК. Понимание метаболизма витамина В12 помогает понять потенциальные причины его дефицита (рисунки 1).

Кобаламин в клетках метаболизируется в два кофермента – аденозилкобаламин (Ado-Cbl) и метилкобаламин (Me-Cbl). Ado-Cbl является коферментом в реакции превращения метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА и участвует в метаболизме аминокислот

Рисунок 1

Метаболизм кобаламина

[Andrès E. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. CMAJ 2004 Aug 03; 171 (3): 251–9. DOI: <https://doi.org/10.1503/cmaj.1031155>]



В желудке кобаламин (Cbl) высвобождается из связи с белком под действием пепсина и соляной кислоты, захватывается гаптокоррином (R-белок, секретируемый слюнными и париетальными клеткам) и транспортируется в 12-перстную кишку. Внутренний фактор (IF) также секретируется в желудке париетальными клетками, но его связывание с Cbl слабое в присутствии желудочного и слюнного R-белка. В 12-перстной кишке Cbl высвобождается из связи с гаптокоррином под действием панкреатических протеаз, образует комплекс Cbl-IF с внутренним фактором и транспортируется в подвздошную кишку. В подвздошной кишке происходит узнавание и захват комплекса Cbl-IF рецепторами энтероцитов (кубилин) и адсорбция Cbl с последующим высвобождением в циркуляцию системы воротной вены в комплексе с транскобаламином (TC II). Утилизация кобаламина клетками происходит посредством рецепторов к TCII.

и жирных кислот, играя ключевую роль в здоровье нейронов. Его серьезный дефицит препятствует физиологическому образованию миелиновой оболочки, нарушая правильную передачу нервных импульсов. На биохимическом уровне его дефицит приводит к увеличению уровня метилмалоновой кислоты. Me-Cbl вместе с фолиевой кислотой – это кофакторы превращения гомоцистеина в метионин, поэтому дефицит Me-Cbl (или фолиевой кислоты) приводит к увеличению уровня гомоцистеина. Me-Cbl имеет решающее значение в синтезе ДНК: его дефицит приводит к нарушению физиологических процессов, таких как гемопоэз, требующих интенсивной репликации клеток, в результате чего возникает мегалобластический тип кроветворения [2].

Причины дефицита витамина B12 у грудных детей.

В развивающихся странах дефицит витамина B12 представляет собой серьезную проблему [3]. К примеру, исследование, проведенное в Турции, показало, что почти 40% женщин репродуктивного возраста имеют алиментарный дефицит витамина B12 [4]. Кроме недостаточного потребления витамина B12, причинами его дефицита может быть синдром мальабсорбции или пернициозная анемия. Из-за отсутствия эндогенного синтеза витамина B12 в организме человека, а также наличия кобаламина только в продуктах животного происхождения (мясные и молочные продукты) вегетарианские диеты могут приводить к дефициту витамина B12. В типичной западной диете человек получает ~ 5–15 мкг витамина B12 ежедневно, что намного превышает рекомендуемую суточную потребность – 2 мкг. Общие запасы Cbl составляют от 2 до 5 мг (~ 60% общего количества B12 в организме хранится в печени и 30% – в мышцах). Обычно люди сохраняют большой запас витамина B12. Его дефицит может развиваться только в течение 2–5 лет при строгом вегетарианстве или наличии выраженной мальабсорбции [5]. Требуется несколько лет диетического дефицита витамина B12 до тех пор, пока состояние станет клинически очевидным. Ежедневная потребность в витамине B12 у детей и подростков колеблется от 0,4 до 2,4 мкг, а его запасы составляют около 25 мкг [6]. Плод человека накапливает от 0,1 до 0,2 мкг витамина B12 в день, следовательно, диетическое потребление витамина B12 беременными женщинами должно увеличиваться с 2 до 2,2 мкг/день [7]. Кобаламин активно переносится через плаценту у плодов кобаламин-дефицитных матерей, и младенцы таких матерей при рождении не отличаются от здоровых ни по гематологическим показателям, ни по физическому развитию. Однако запасы кобаламина у них низки, а поскольку уровень кобаламина в грудном молоке тоже низок (находится в прямой зависимости от концентрации кобаламина в сыворотке крови), с ростом младенца прогрессирование дефицита витамина B12 происходит достаточно быстро. В течение первых 6 недель жизни наблюдается значительное снижение кобаламина в сыворотке крови, что отражает эффективное его использование в растущем организме в сочетании с пограничными запасами и недостаточным поступлением извне [8]. Учитывая, что характерной особенностью у грудных детей с дефицитом витамина B12 является отказ от прикормов, они длительное время остаются исключительно на грудном вскармливании, что быстро приводит к истощению запасов витамина B12 при отсутствии его поступления с прикормами.

Клиническая картина. Классическое проявление дефицита витамина B12 – гематологическое расстройство в виде анемии. Анемия при дефиците

витамина В12 – макроцитарная (MCV повышен до 95–110 фл при легкой и умеренной анемии и до 110–150 фл – при более тяжелой), гиперхромная (МСН увеличен до 33–38 пг при умеренной анемии и до 56 пг – при тяжелой), гипорегенераторная; в тяжелых случаях развивается панцитопения. В мазке периферической крови появляются макроэритроциты, анизо-/пойкилоцитоз, кольца Кебота, тельца Жолли, гиперсегментированные нейтрофилы. Кроме того, мегалобластический эритропоэз характеризуется повышенным распадом мегалобластов в костном мозге, гемолизом макроцитов в селезенке, что проявляется повышением ЛДГ, билирубина за счет не прямой фракции, а также желтушностью кожных покровов, реже – потемнением мочи и увеличением селезенки [9]. Однако, помимо классических гематологических проявлений, дефицит кобаламина приводит к нарушению нейропсихических и когнитивных функций, особенно у маленьких детей и пожилых людей [10]. Витамин В12 играет важную роль в нейронной миелинизации, синаптогенезе, синтезе нейротрансмиттеров с потенциальным воздействием на когнитивное развитие, а в конечном итоге – когнитивное функционирование. Дефицит витамина В12 может нарушить эти процессы и привести к повреждению нервов и атрофии мозга [11]. В эпидемиологических исследованиях показано, что недостаточность витамина В12 в период внутриутробного развития плода ассоциируется с патологией развития мозга и нарушением психомоторных функций, при этом последствия дефицита кобаламина на ранних сроках гестации могут быть необратимыми [12, 13].

Клинические признаки и симптомы дефицита витамина В12 у детей появляются в возрасте 4–12 мес. – это раздражительность, апатия, анорексия, отказ от прикормов, задержка темпов развития; позже присоединяются гематологические и неврологические симптомы [14]. Неврологические симптомы у грудных детей развиваются при долгосрочном глубоком дефиците витамина В12, что приводит к неадекватной миелинизации белого вещества головного и спинного мозга, тяжелой церебральной атрофии, проявляется регрессом навыков развития, летаргией, двигательными расстройствами (тремор, миоклонус, хореоатетойдные движения, судороги). Реже двигательные расстройства появляются через несколько дней после начала лечения, при этом другие неврологические симптомы улучшаются. В редких случаях дефицит витамина В12 может стать причиной эпилептических припадков в младенчестве [14–16]. В тематических исследованиях неврологической манифестации дефицита кобаламина среди детей исключительно на грудном вскармливании (в возрасте от 6 до 10 мес.) у матерей-вегетарианок показано, что благоприятный ответ достигается с помощью

терапии витамином В12, при этом неврологические симптомы улучшаются уже через несколько дней после начала лечения. На фоне терапии кобаламином у большинства детей неврологическая симптоматика регрессирует, однако ее полнота и скорость варьируют: у некоторых, несмотря на проведенное лечение, может сохраняться неврологический дефицит разной выраженности [17, 18]. Долгосрочный прогноз зависит от общей продолжительности дефицита кобаламина и тяжести симптомов, а не от уровня сывороточного витамина В12 или гемоглобина при манифестации заболевания. Более благоприятный неврологический исход наблюдается у новорожденных, лечение которых проведено в возрасте до 1 года, чем у детей, получавших лечение в более поздний период. Следует помнить, что начальное улучшение после лечения может не привести к благоприятному исходу в долгосрочной перспективе [19, 20].

Диагностика. Общепринятый и общедоступный лабораторный тест дефицита витамина В12 – исследование его концентрации в сыворотке крови. Снижение его < 200 пг/мл при наличии симптоматики – достаточное основание для постановки диагноза и проведения терапии. В сомнительных случаях необходимо изучение вовлеченных в те же метаболические процессы, что и витамин В12, субстратов (гомоцистеин, метилмалоновая кислота), по уровню которых судят о метаболическом или биохимическом дефиците витамина В12. Особенно важны для диагностики результаты этих исследований при промежуточном уровне витамина В12 (от 200 до 400 пг/мл) [8]. В некоторых исследованиях показана более высокая специфичность определения голотранскобаламина. Диагностические преимущества этого теста позволяют предполагать, что в ближайшем будущем он будет рассматриваться в качестве метода выбора для диагностики дефицита витамина В12 [21].

При отсутствии дефицита витамина В12 у матери грудного ребенка следует заподозрить врожденную патологию (наследственный дефицит транскобаламина II, врожденные нарушения метаболизма кобаламина и др.). Наследственный дефицит транскобаламина II следует учитывать при дифференциальной диагностике состояния любого грудного ребенка с панцитопенией, задержкой темпов развития, поносом и рвотой. Это серьезное расстройство с истощением внутриклеточного кобаламина в результате нарушения его транспорта и утилизации клетками, характерный лабораторный феномен которого – повышение концентраций гомоцистеина и метилмалоновой кислоты при нормальной концентрации витамина В12 [22].

Наследственные нарушения метаболизма внутриклеточного кобаламина обусловлены недостаточным синтезом одного или обоих коферментов – Ado-Cbl

или Me-Cbl, поэтому и клинические проявления, и возраст манифестации этих расстройств варьируемы: новорожденные с задержкой внутриутробного развития и микроцефалией; младенцы с задержкой темпов развития, бледностью, неврологическими симптомами; дети раннего возраста с цитопениями (включая мегалобластную анемию), задержкой темпов развития, энцефалопатиями, неврологическими симптомами в виде гипотонии и судорог, а также подростки и взрослые с нейропсихиатрическими симптомами, прогрессирующим когнитивным дефицитом и/или подострой комбинированной дегенерацией спинного мозга. Биохимические маркеры нарушений метаболизма внутриклеточного кобаламина: повышение метилмалоновой кислоты в сыворотке крови и моче, гипергомоцистеинурия, гипометионинемия. Диагноз подтверждает идентификация биаллельных патогенных мутаций в одном из следующих генов: MMACHC (cblC), MMADHC (cblD и cblD, вариант 1), MTRR (cblE), LMBRD1 (cblF), MTR (cblG) и ABCD4 (cblJ) [23].

Лечение витамин В12-дефицитной анемии с неврологической манифестацией предполагает назначение цианокобаламина в повышенных дозах – как правило, 1000 мкг [24–26]. Тематический анализ публикаций, посвященных неврологической манифестации дефицита кобаламина среди детей исключительно на грудном вскармливании у матерей-вегетарианок, показал вариабельность доз (от 250 до 3000 мкг), методов введения (только парентерально, внутримышечно или внутривенно, перорально или парентерально с переходом на пероральный прием) и длительности терапии (от 5 внутримышечных инъекций до приема перорально в течение нескольких месяцев). В то же время установлено, что неврологические симптомы улучшаются уже через несколько дней после начала лечения, однако начальное улучшение на фоне лечения может не привести к полному выздоровлению в долгосрочной перспективе. Более благоприятный неврологический исход наблюдается у новорожденных, лечение которых проведено в возрасте до 1 года, чем у детей, получивших его в более поздний период [19, 25, 27–29]. Оптимальным режимом терапии при врожденном дефиците транскобаламина II признаны как минимум еженедельные (1–2 раза в неделю) инъекции цианокобаламина в дозе 1000 мкг, поскольку при высоких показателях кобаламина в сыворотке он может переноситься в клетку без участия транскобаламина II [22, 30].

Клинический случай № 1

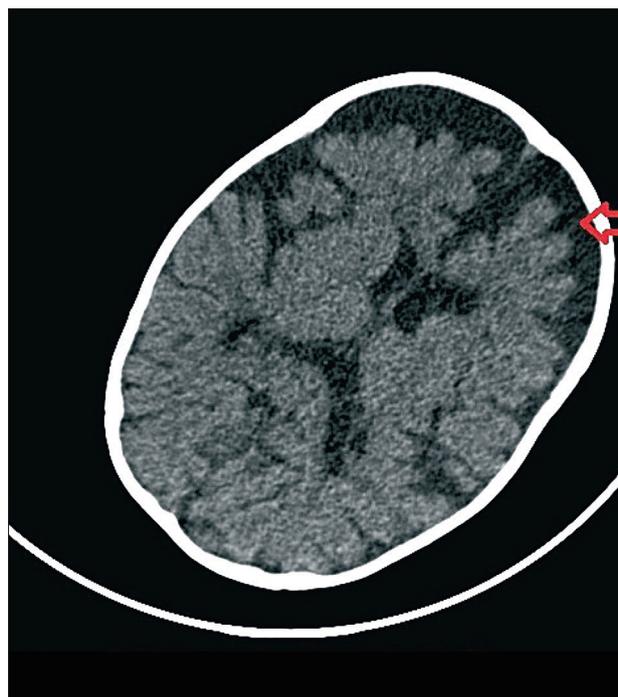
Мальчик К., 11 мес., направлен к гематологу по поводу анемии. При первичном осмотре жалобы на заторможенность, сонливость, отсутствие мышечной активности (не держит голову, не переворачивается,

не сидит, не играет в игрушки), периодически «дрожание мышц», отсутствие улыбки, лепета.

Родители дали согласие на использование персональных данных в клинических исследованиях и публикациях. Данные анамнеза: ребенок от 4-й беременности, протекавшей с угрозой прерывания, отеками, анемией (Hb – 84–95 г/л, в связи с чем мама получала пероральную ферротерапию), вторых срочных родов (1-я и 3-я беременности закончились выкидышами на ранних сроках; ребенок от 2-й беременности здоров). У мамы хроническая анемия наблюдалась с 10 лет (с ее слов, Hb – 80–100 г/л), в связи с чем периодически курсами принимает препараты железа без стойкого эффекта. Ребенок родился доношенным, с удовлетворительными весо-ростовыми показателями (масса тела – 3100 г; рост – 51 см), нормально развивался до 6 мес. (улыбался, держал голову, переворачивался на живот). С возраста 6–7 мес. родители стали замечать у мальчика регресс имеющихся навыков: он стал менее активен, менее эмоционален, отказался от прикормов (до момента обследования находился исключительно на грудном вскармливании). К возрасту 9 мес. ребенок не держал голову, не сидел, не улыбался, не гулил, был безучастен к окружающим; в 10 мес. появилось выраженное беспокойство при пассивных движениях (поднятии на руки, смене подгузника) в виде монотонного крика, отсутствия зрительного контакта, напряжения и дрожания мышц туловища и конечностей, что было расценено как эквивалент болевого синдрома.

Рисунок 2

Рентгеновская компьютерная томография головного мозга: в лобных долях визуализируется относительно небольшое количество широких и плоских извилин (предоставлена с согласия родителей ребенка)



С подозрением на травму/опухоль позвоночника ребенок был госпитализирован в стационар. По данным рентгеновской компьютерной томографии (РКТ) головного мозга описана картина мальформации головного мозга по типу пахигиирии, гипоплазии мозолистого тела, что интерпретировано как врожденный порок развития ЦНС (рисунк 2); по данным РКТ грудного и поясничного отделов позвоночника патологии не выявлено. На момент осмотра гематологом ребенку было 11 мес., рост – 74 см (50 перцентиль); масса тела – 8600 г (10–25 перцентиль), сомноленция, адинамия, общая гипотония мышц, бледность, субиктеричность кожных покровов.

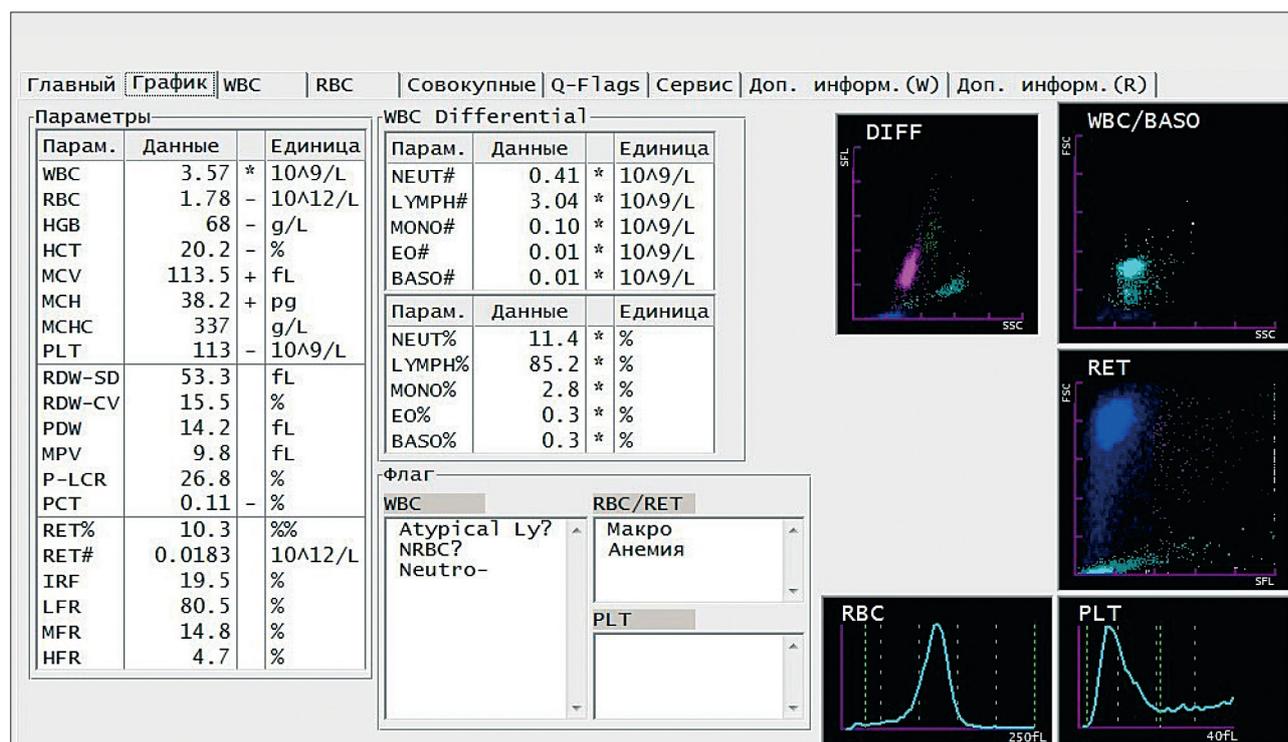
Лабораторно в гемограмме – трехростковая цитопения (рисунк 3): макроцитарная анемия тяжелой степени (эритроциты – 1,8 млн/мкл; Hb – 68 г/л; MCV – 113,5 фл), тромбоцитопения (113 тыс./мкл), лейкопения/нейтропения (лейкоциты – 3,6 тыс./мкл; абсолютное количество нейтрофилов – 410/мкл), гиперсегментированные нейтрофилы. В миелограмме встречается большое количество мегалобластов. Биохимический анализ крови: повышены концентрации ЛДГ (4755 ЕД/л), билирубина за счет непрямой фракции (33,5–29,4 мкмоль/л). Выявлен глубокий дефицит витамина В12: снижение концентрации кобаламина до 42 пг/мл, повышение концентрации гомоцистеина до 62,3 мкмоль/л (норма 5–15) при нормальных показателях ферритина сыворотки (111,5 мкг/л).

При обследовании мамы выяснено, что она не вегетарианка (папа – вегетарианец); показатели общего анализа ее крови находятся в пределах нормы (Hb – 123 г/л; MCV – 88,4 фл; тромбоциты – 206 тыс./мкл; лейкоциты – 5,6 тыс./мкл). Дальнейшее обследование выявило дефицит витамина В12: снижение концентрации кобаламина в сыворотке крови (146 пг/мл), повышение концентрации гомоцистеина (27,0 мкмоль/л – маркер метаболического дефицита витамина В12); дефицит железа (снижение ферритина сыворотки – 4,8 мкг/л); выявлены также аутоантитела к париетальным клеткам (результат строго положительный) при отсутствии аутоантител к внутреннему фактору.

Ребенку начата терапия цианокобаламином – 1000 мкг внутримышечно, через день. На фоне лечения в течение первых 3-х суток ребенок стал активнее, эмоциональнее, однако присоединился выраженный тремор конечностей, угас глотательный рефлекс, в связи с чем проводилось зондовое кормление. После курса терапии цианокобаламином (10 инъекций) ребенок стал активным, эмоциональным, начал держать голову, переворачиваться, играть в игрушки, гулить, однако сохранялся крупноразмашистый тремор (регрессировал в течение 6 недель); зафиксированы фокальные судороги. По назначению невролога была начата противосудорожная терапия, на фоне которой приступы судорог купированы. Гематологический ответ на терапию

Рисунок 3

Гемограмма пациента К. (Sismex XT2000i)



цианокобаламином полный. На 5-е сут терапии отмечены ретикулоцитарный криз (ретикулоциты – 119‰), нормализация показателей лейкоцитов и тромбоцитов.

При катamnестическом анализе в возрасте 1 года 6 мес. ребенок отстает в психомоторном развитии: умеет ползать, вставать у опоры, переступать, ходить, держась за руку, активен лепет, но с трудом понимает обращенную речь, просьбы не выполняет, навыки опрятности и самообслуживания не сформированы. На фоне противосудорожной терапии приступы не повторялись. Контроль РКТ головного мозга не проводили во избежание наркоза.

В семье есть старший ребенок – девочка, 8 лет, у которой имеются проблемы с обучаемостью в 1-м классе; она наблюдается у невролога и психолога по поводу снижения когнитивных функций, дефицита в эмоционально-волевой сфере. Из анамнеза известно, что с возраста 2 лет девочка наблюдалась у гематолога по поводу лейкопении, нейтропении (снижение лейкоцитов до 2,7 тыс./мкл; абсолютное количество нейтрофилов – 190–504/мкл), тромбоцитопении (минимально – 102 тыс./мкл). В возрасте 5 лет была диагностирована железodefицитная анемия (Hb – 101 г/л; MCV – 75 фл; ферритин сыворотки – 5,9 мкг/л); сохранялась умеренная тромбоцитопения (137–148 тыс./мкл) при нормальном показателе лейкоцитов. Получала ферротерапию, контроль эффективности не проводили.

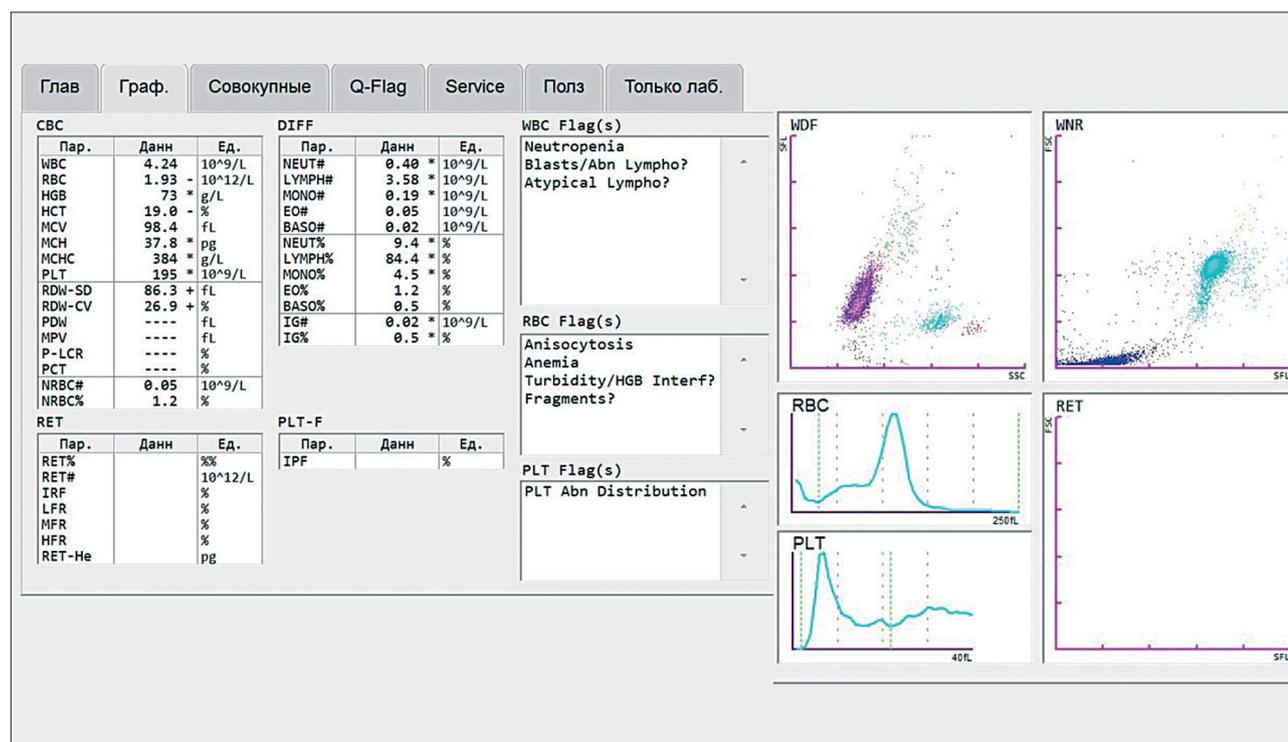
С учетом отягощенного анамнеза ребенок был приглашен на обследование. Выявлен дефицит витамина B12 (90 пг/мл), дефицит железа (ферритин сыворотки – 6,5 мкг/л; показатели гемограммы в норме). Учитывая наличие в рационе ребенка достаточного количества мясных и молочных продуктов (со слов родителей), проведено обследование на целиакию (АТ к тканевой трансглутаминазе не выявлены), анализ мочи на микропротеинурию для исключения синдрома Имерслунд–Гресбека (протеинурия не выявлена). Ребенку назначили лечение: препараты железа внутрь, витамин B12 парентерально (цианокобаламин – 200 мкг, внутримышечно, № 10) – концентрация кобаламина нормализована. Планируется динамическое наблюдение и при необходимости своевременное дообследование в отношении врожденных патологий (врожденный дефицит внутреннего фактора, врожденные нарушения метаболизма кобаламина и др.).

Клинический случай № 2

Девочка В., диагноз «витамин B12-дефицитная анемия» установлен в возрасте 1 года 2 мес. Родители дали согласие на использование персональных данных в клинических исследованиях и публикациях. Из анамнеза: ребенок родился доношенным с удовлетворительными весо-ростовыми показателями; по физическому и нервно-психическому развитию соответствовал своему возрасту. Обращал на себя внимание факт отказа ребенка от своевременно вводи-

Рисунок 4

Гемограмма пациентки В. (Sismex XN-1000)



мых прикормов: девочка находилась исключительно на грудном вскармливании. В возрасте 10 мес. при медицинском осмотре выявлена нормохромная анемия (эритроциты – 3,3 млн/мкл; Hb – 97 г/л; MCV – 85,6 фл). Ребенок консультирован гематологом: верифицирован абсолютный дефицит железа (ферритин – 0,3 мкг/л), в связи с чем проводилась ферротерапия пероральными препаратами железа. На фоне ферротерапии в течение 3 мес. отмечено повышение концентрации гемоглобина до 108 г/л и количества эритроцитов – до 4,02 млн/мкл при нарастании MCV (98,2 фл). Терапию препаратами железа продолжали (прием препарата был сильно затруднен, так как ребенок выталкивал его изо рта, как и все, кроме грудного молока). Несмотря на проводимую терапию, мама отмечала нарастающую вялость, заторможенность, сонливость (вне кормлений ребенок спал), бледность, желтушность кожи и слизистых, в связи с чем ребенок был повторно направлен к гематологу.

Возраст девочки на момент повторного осмотра гематологом – 1 год 2 мес., рост – 75 см (10–25 перцентиль); масса тела – 11 300 г (75–90 перцентиль), сомноленция, адинамия, бледность, субиктеричность кожных покровов. Лабораторно в гемограмме – макроцитарная анемия средней степени тяжести (эритроциты – 1,93 млн/мкл; Hb – 73 г/л; MCV – 98,4 фл); лейкопения/нейтропения (лейкоциты – 4,2 тыс./мкл; АКН – 400/мкл) (рисунки 4).

В биохимическом анализе крови повышены концентрации ЛДГ (930 ЕД/л); билирубина за счет непрямой фракции (33,9–29,0 мкмоль/л). Выявлен дефицит витамина В12 (снижение концентрации кобаламина < 125 пг/мл), дефицит железа (снижение концентрации ферритина – 9,2 нг/мл) при нормальных показателях концентрации фолиевой кислоты в сыворотке.

При обследовании мамы выяснено, что она не вегетарианка; показатели общего анализа ее крови находятся в пределах нормы (Hb – 118 г/л; MCV – 88,4 фл; тромбоциты – 206 тыс./мкл; лейкоциты – 5,6 тыс./мкл). Дальнейшее обследование выявило дефицит витамина В12 (снижение концентрации кобаламина в сыворотке крови – 160 пг/мл); дефицит железа (снижение ферритина сыворотки – 7,0 нг/мл); выявлены аутоантитела к париетальным клеткам (результат строго положительный), внутреннему фактору (результат слабо положительный). Ребенку начата терапия цианокобаламином – 1000 мкг, внутримышечно, через день. На этом фоне в течение первых 3-х суток отмечен полный регресс всех неврологических симптомов; на 7-е сут терапии – ретикулоцитарный криз (ретикулоциты – 76%); к 14-му дню – полное восстановление всех показателей гемограммы.

ВЫВОДЫ

Представлены клинические случаи витамин В12-дефицитной анемии у детей исключительно на грудном вскармливании мамами с нераспознанной пернициозной анемией. Характерная особенность течения витамин В12-дефицитной анемии у детей грудного возраста – неврологическая симптоматика в виде регресса навыков, летаргии. Долгосрочный глубокий дефицит витамина В12 у ребенка К. (с 6 мес. – регресс навыков, прогрессирующая неврологическая симптоматика, а верификация дефицита витамина В12 и лечение – в возрасте 11 мес.) привел к тяжелой церебральной атрофии. Несмотря на проведенное лечение, у ребенка сохраняется выраженный неврологический дефицит, долгосрочный прогноз не определен. У его сестры, 8 лет, вероятно, также имел место долгосрочный дефицит витамина В12, результатом чего стало нарушение процессов нейронной миелинизации и синаптогенеза, приведшее в итоге к нарушению когнитивных функций. У девочки В. своевременно поставленный диагноз и проведенная терапия привели к полному регрессу всех симптомов.

Таким образом, дефицит витамина В12 следует учитывать при наличии характерных неврологических симптомов у младенцев, особенно при наличии мегалобластной анемии/цитопений и задержки развития. При раннем выявлении и своевременном лечении можно предотвратить потенциально необратимые неврологические повреждения – нейropsychические и когнитивные расстройства.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Lunyakova M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4543-2945>

Demikhov V.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6120-4678>

Dronova S.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7691-0316>

Kalinina Yu.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7280-7212>

Zhurina O.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2159-582X>

Литература

- Kliegman R.M., Stanton B.F., St. Geme J.W., 3rd, Schor N.F., Behrman R.E. Vitamin B12 (Cobalamin). In: Sachdev HPS, Shah D, editors; Nelson textbook of pediatrics. 19th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011; pp. 197–8.
- Schrier S.L. Hematology ASH, and the anemia of the aged. *Blood* 2005; 106 (10): 3341–2.
- de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008; 29: S238–44.
- Karaoglu L., Pehlivan E., Egri M., Deprem C., Gunes G., Genc M., et al. Research article The prevalence of nutritional anemia in pregnancy in an east Anatolian province, Turkey. *BMC Public Health* 2010; 10: 329.
- Oh R.C., Brown D.L. Vitamin B12 Deficiency *Am Fam Physician* 2003 Mar 1; 67 (5): 979–86.
- Rasmussen S.A., Fernhoff P.M., Scanlon K.S. Vitamin B12 deficiency in children and adolescents. *J Pediatr* 2001; 138: 10–7.
- Allen L.H. Vitamin B12 metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. *Adv Exp Med Biol* 1994; 352: 173–86.
- Bjørke Monsen A.L., Ueland P.M., Vollset S.E., Guttormsen A.B., Markesstad T., Solheim E., et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics* 2001; 108: 624–30.
- Румянцев А.Г., Масчан А.А., Демидов В.Г., Скобин В.Б., Журин О.Н. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению анемии, обусловленной дефицитом В12. – М., 2015.
- Molloy A.M., Kirke P.N., Brody L.C., Scott J.M., Mills J.L. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull* 2008; 29 (2 Suppl): S101–11; discussion S12–5.
- Dror D.K., Allen L.H. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutr Rev* 2008; 66 (5): 250–5.
- Pepper M.R., Black M.M. B12 in fetal development. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22: 619–23.
- Venkatramanan S., Armata I.E., Strupp B.J., Finkelstein J.L. Vitamin B12 and Cognition in Children. *Adv Nutr* 2016 Sep; 7 (5): 879–88.
- Chalouhi C., Faesch S., Anthoine-Milhomme M.-C., Fulla Y., Dulac O., Chéron G. Neurological consequences of vitamin B12 deficiency and its treatment. *Pediatr Emerg Care* 2008; 24: 538–41.
- Graham S.M., Arvela O.M., Wise G.A. Long-term neurologic consequences of nutritional vitamin B12 deficiency in infants. *J Pediatr* 1992; 121 (Pt 1): 710–4.
- Black M.M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull* 2008; 29: S126–31.
- Kuhne T., Bubl R., Baumgartner R. Maternal vegan diet causing a serious infantile neurological disorder due to vitamin B12 deficiency. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 205–8.
- Wighton M.C., Manson J.I., Robertson E., Chapman E. Brain damage in infancy and dietary vitamin B12 deficiency. *Med J Aust* 1979; 2: 1–3.
- von Schenck U., Bender-Götze C., Koletzko B. Persistence of neurological damage induced by dietary vitamin B-12 deficiency in infancy. *Arch Dis Child* 1997; 77: 137–9.
- Korenke G.C., Hunneman D.H., Eber S., Hanefeld F. Severe encephalopathy with epilepsy in an infant caused by subclinical maternal pernicious anaemia: case report and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2004; 163 (4–5): 196–201.
- Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency. An update. *Haematologica* 2006; 91: 1506–12.
- Trakadis Y.J., Alfares A., Bodamer O.A., Buyukavci M., Christodoulou J., Connor P., et al. Update on transcobalamin deficiency: clinical presentation, treatment and outcome. *J Inher Metab Dis* 2014 May; 37 (3): 461–73.
- Carrillo N., Adams D., Venditti C.P. Disorders of Intracellular Cobalamin Metabolism. Initial Posting: February 25, 2008. Last Update: November 21, 2013. GeneReviews Advanced Search.
- Kocaoglu C., Akin F., Caksen H., Böke S.B., Arslan S., Aygün S. Cerebral atrophy in a vitamin B12-deficient infant of a vegetarian mother. *J Health Popul Nutr* 2014 Jun; 32 (2): 367–71.
- Codazzi D., Sala F., Parini R., Langer M. Coma and respiratory failure in a child with severe vitamin B 12 deficiency. *Pediatr Crit Care Med* 2005 Jul; 6 (4): 483–5.
- Renault F., Verstichel P., Ploussard J.P., Costil J. Neuropathy in two cobalamin-deficient breast-fed infants of vegetarian mothers. *Muscle Nerve* 1999 Feb; 22 (2): 252–4.
- Gambon R.C., Lentze M.J., Rossi E. Megaloblastic anaemia in one of monozygous twins breast-fed by their vegetarian mother. *Eur J Pediatr* 1986 Dec; 145 (6): 570–1.
- Ciani F., Poggi G.M., Pasquini E., Donati M.A., Zammarchi E. Prolonged exclusive breastfeeding from vegan mother causing an acute onset of isolated methylmalonic aciduria due to a mild mutase deficiency. *Clin Nutr* 2000 Apr; 19 (2): 137–9.
- From the Centers for Disease Control and Prevention. Neurologic impairment in children associated with maternal dietary deficiency of cobalamin – Georgia, 2001. *JAMA* 2003 Feb 26; 289 (8): 979–80.
- Unal S., Rupa T., Yetgin S., Yarali N., Dursun A., Gursel T., et al. Transcobalamin II Deficiency in Four Cases with Novel Mutations. *Turkish Journal of Hematology* 2015; 32: 317–22.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 14.05.2019

Принята к печати 10.06.2019

Синдромальная венозная мальформация – диссеминированный венозный ангиоматоз Бина

Л.А. Хачатрян, И.С. Клецкая, Е.В. Орехова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Контактная информация:

Хачатрян Лили Альбертовна, канд. мед. наук, врач-гематолог, заведующая боксированным отделением гематологии/онкологии НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: Lili.2510@yandex.ru

Синдром Бина – редко встречающийся диффузный кожно-слизистый ангиоматоз (множественные венозные мальформации кожи и внутренних органов). В основе патогенеза заболевания лежит соматическая мутация в гене *TEK*. Данная мутация вызывает лиганд-независимую активацию рецептора тиразинкиназы и PI3K/AKT-пути, вовлекая специфическим образом в патологический процесс mTOR. Универсально эффективных методов лечения системных форм сосудистых мальформаций нет, однако в последнее время многочисленные сообщения показывают преимущества рапамицина – ингибитора mTOR – в качестве хорошо переносимой и эффективной терапии у пациентов с сосудистыми аномалиями, в частности с диффузным ангиоматозом. В статье представлен клинический случай: пациентка, 5 лет, которая длительное время наблюдалась с диагнозом «железодефицитная анемия», получала терапию препаратами железа – без эффекта. Диагноз «синдром Бина» был установлен через 5 лет после появления первых клинических симптомов на основании совокупности клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования. Выявлена природа железодефицитной анемии – хронические повторные кровотечения из множественных участков патологически сформированных сосудов слизистой желудочно-кишечного тракта. Терапия рапамицином, назначенная пациентке, позволила купировать желудочно-кишечные кровотечения, сократить размеры сосудистых образований и предотвратить формирование новых. Родители пациентки дали согласие на использование информации, в том числе фото ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: синдром Бина, сосудистая мальформация, венозный ангиоматоз, рапамицин

Хачатрян Л.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 78–87.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-78-87

© 2019 by NMRC PHOI

Received 14.05.2019

Accepted 10.06.2019

Syndrome associated with multiple venous malformations (Bean syndrome)

L.A. Hachatryan, I.S. Kletskaia, E.V. Orekhova

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Correspondence:
Lili A. Hachatryan, MD, hematologist,
Head of Box Department of Hematology/
Oncology Dmitriy Rogachev National
Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology, Immunology
Ministry of Healthcare of Russian
Federation.
Address: Russia 117997, Moscow,
Samory Mashela st., 1
E-mail: Lili.2510@yandex.ru

Blue rubber bleb nevus syndrome (BRBNS) also called Bean's syndrome is a rare disorder characterized by mucocutaneous angiomatose multiple cutaneous venous malformations. Pathogenesis of the BRBNS is caused by the somatic mutations in angiopoietin receptor gene *TEK*. These mutations cause ligand-independent activation of the tyrosine kinase receptor and the PI3K / AKT pathway and involve the mTOR in the pathological process in a specific way. There are no universally effective methods for treating systemic forms of vascular malformations currently. However, recent numerous reports have shown the advantages of rapamycin, an mTOR inhibitor, as a well-tolerated and effective therapy in patients with vascular abnormalities, in particular with diffuse angiomatose. This article presents a clinical case of a 5-years old patient with a diagnosis of iron deficiency anemia, who has been treated for a long time and received iron supplements therapy without achieving any effect. The diagnosis of Bean's syndrome was established after 5 years from the first clinical manifestation and based on clinical, laboratory and instrumental methods. The cause of iron deficiency anemia was established. It was repeated chronic bleedings from multiple sites of the gastrointestinal mucosa vessels. Prescribed rapamycin therapy allowed to contain gastrointestinal bleeding, to reduce the size of vascular lesions and to prevent the formation of new ones. Parents gave their consent to use information about the child in the article.

Key words: Bean syndrome, vascular malformation, venous angiomatosis, rapamycin

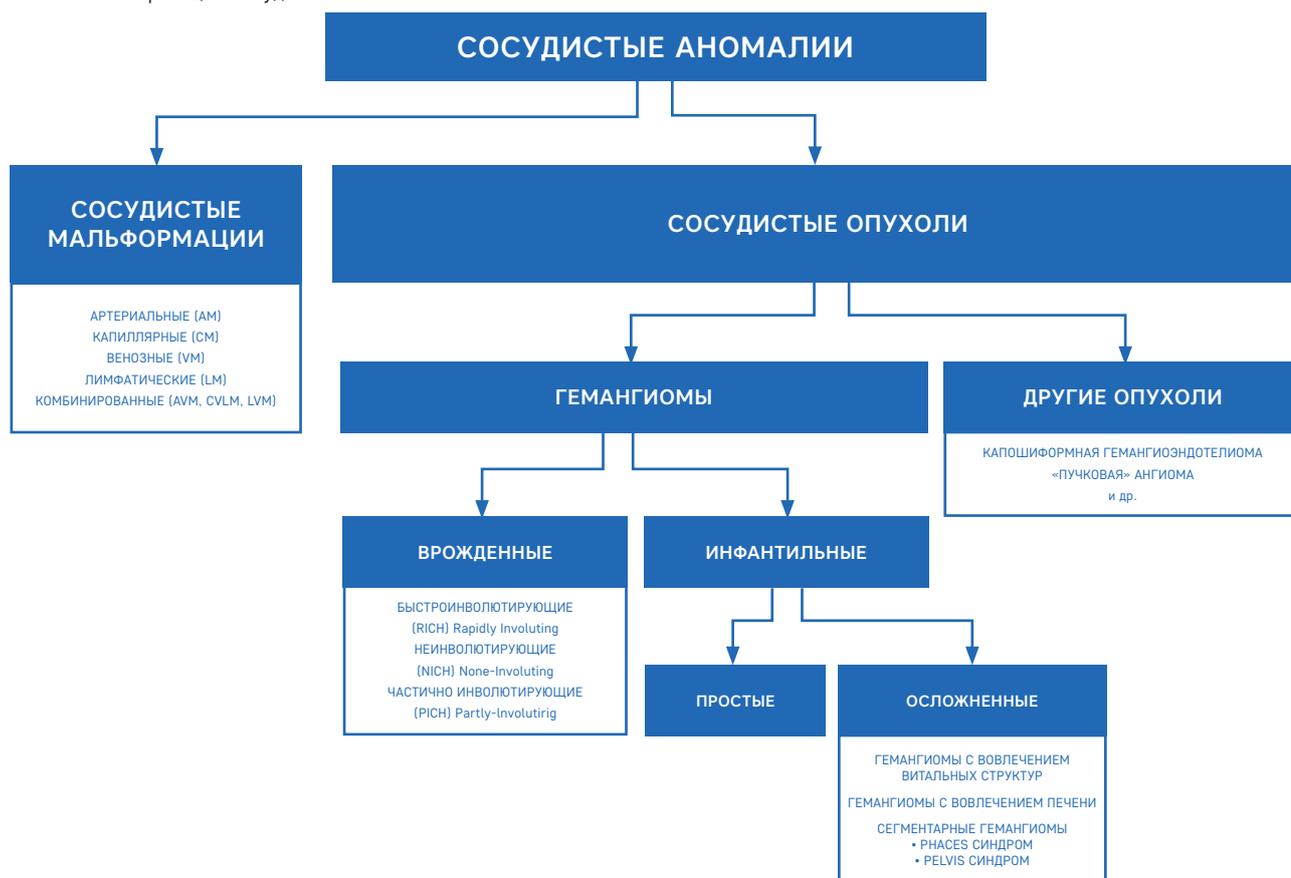
Hachatryan L.A., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 78–87.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-78-87

Термин «ангиома», или сосудистая аномалия (рисунки 1) [1], объединяет многие заболевания, имеющие разные клинику, патофизиологию, эволюцию и подходы к терапии. В настоящее время ISSVA (*International Society for the Study of*

Vascular Anomalies) выделяет две большие группы сосудистых аномалий – сосудистые опухоли и сосудистые мальформации. Сосудистые опухоли, их называют также гемангиомы, возникают обычно после рождения и с гистологической точки зрения

Рисунок 1

Схема-классификация сосудистых аномалий



Примечание: RICH – Rapidly Involuting Congenital Hemangioma (быстроинволютирующая); NICH – Non Involuting Congenital Hemangioma (неинволютирующая); PICH – Partly Involuting Congenital Hemangioma (частично инволютирующая); PHACES – Posterior fosse abnormalities/Hemangioma/Arteries anomalies/Coarctation aortic/Eyes troubles/Sternal malformations; PELVIS – Perineal angioma, External genital malformation, Lipomyelomeningocele, Vesicorenal abnormalities, Imperforate anus, Skin tag/SACRAL (Spinal dysraphism, Anogenital, Cutaneous, Renal and urologic malformation, Angioma Lombosacral).

характеризуются пролиферацией эндотелиальных клеток. По биологическому поведению сосудистые опухоли подразделяют на доброкачественные (гемангиомы), локально агрессивные/редко метастазирующие (гемангиоэндотелиомы, за исключением эпителиоидной) и злокачественные (эпителиоидная гемангиоэндотелиома и ангиосаркома). Опухоли, наиболее часто встречающиеся у детей, – гемангиомы, в большинстве случаев имеющие склонность к спонтанному регрессу.

Сосудистые мальформации имеются с рождения, хотя не всегда визуализируются клинически, и представляют собой морфогенетическую аномалию сосудистой сети без пролиферации эндотелиальных клеток, именно поэтому они никогда не регрессируют. Частота встречаемости составляет 1–1,5% в общей популяции, по данным молекулярно-генетической лаборатории клинического университета *Saint-Luc*. Ангиомы-мальформации в свою очередь разделены на две группы: мальформации с низким кровотоком (*slow-flow*) – капиллярные, венозные, лимфатические или комбинированные мальформации и мальформации с высоким кровотоком (*fast-flow*) – артериальные, артериовенозные, артериовенозные фистулы.

Венозные мальформации – сосудистые аномалии с низким кровотоком – представлены патологически сформированными венами с характерной особенностью – плохо развитым мышечным слоем (дефицит гладких мышечных клеток) [2]. Это самый часто встречающийся вариант сосудистой мальформации. Венозные мальформации имеют локализованный или диффузный характер, могут располагаться поверхностно или глубоко на любом участке тела, затрагивая любую ткань. Ангиомы-мальформации, как и ангиомы-опухоли, чаще всего поражают мягкие ткани (кожу, подкожную жировую клетчатку, мышцы). Но в патологический процесс могут быть вовлечены суставы, нервы, а также костная ткань. Венозные мальформации (один из вариантов которых описан в этой статье) характеризуются венозным застоем и развитием локальной внутрисосудистой коагулопатии [3]. Риск этого осложнения увеличивается при диффузных или мультифокальных поражениях с развитием значимой коагулопатии потребления. При хроническом

течении локальной внутрисосудистой коагулопатии развиваются флеболиты [4].

Чаще всего мальформации имеют изолированный характер, но могут быть интегрированы в более сложный синдром – спорадический или генетически детерминированный. В 1% случаев семейных форм венозных мальформаций (с вовлечением кожи и слизистых оболочек) выявлен аутосомно-доминантный тип наследования [5]. Приблизительно в половине случаев венозных мальформаций выявляется мутация в гене *TEK* (по данным молекулярно-генетической лаборатории клинического университета *Saint-Luc*).

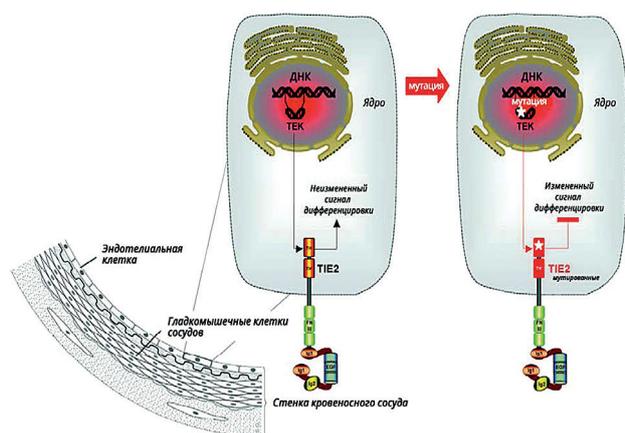
Синдром Бина – редкий синдром, представляющий собой диффузный кожно-слизистый ангиоматоз (множественные венозные мальформации кожи и внутренних органов), получил свое название – *Blue rubber bleb nevus syndrome* (BRBNS) – по характерным кожным проявлениям, которые впервые описал *William Bean* в 1958 году [6].

Эпидемиология. Достоверная эпидемиология BRBNS неизвестна, однако есть данные, что этот синдром выявляют с частотой 1 на 14 000 новорожденных [7]. В англоязычной литературе описано около 200 случаев данного заболевания. Тип наследования не установлен. Как правило, это спорадические случаи, хотя известны несколько семейных случаев с аутосомно-доминантным типом наследования [8].

Патогенез. Известно, что в основе патогенеза заболевания лежит соматическая мутация в гене *TEK* [9], локализованном на коротком плече 9 хромосомы (9p21) [5, 10]. В исследовании *J. Soblet и соавт.* (2017) у 15 из 17 пациентов

Рисунок 2

Схема патогенеза синдрома Бина: при спорадических формах венозных мальформаций происходит мутация в гене *TEK* в эндотелиальных клетках; эта мутация ДНК приводит к синтезу дефектного белка TIE2, который посылает измененные сигналы дифференцировки внутрь клетки, нарушая нормальное развитие вен; участки мальформации соответствуют только той области, где произошла мутация гена в эндотелиальных клетках



с синдромом Бина выявлены соматические мутации (точечные) в 17 и 23 экзонах гена *TEK* [11]. Ген *TEK* кодирует белок TIE2 – внутриклеточные домены рецептора тирозинкиназы в эндотелиальных клетках (рисунки 2) – рецептора для ангиопоэтина. Этот белок участвует в передаче сигнала дифференцировки извне внутрь клетки и играет ключевую роль в развитии, интеграции и стабильности сосудов. У пациентов с венозными мальформациями белок TIE2 находится в более активном состоянии, перманентно передавая сигнал дифференцировки внутрь клетки [12].

Данная мутация вызывает лиганд-независимую активацию рецептора тирозинкиназы и PI3K/AKT-пути, специфическим образом вовлекая в патологический процесс mTOR-белок и увеличивая колониюобразование клеток, их миграцию, инвазию и выживаемость [11] (см. рисунок 13). Таким образом, все эндотелиальные клетки, несущие данную мутацию, теряют свою нормальную функцию, как результат происходит рост и пролиферация сосудов, которые принимают «причудливый» характер, формируя венозную мальформацию.

Клинические проявления. Как правило, выявляемые с рождения венозные мальформации носят мультифокальный характер и локализованы:

- на коже/под кожей (93%) – преимущественно на коже туловища и конечностей с типичным поражением подушечек пальцев рук и ног [13];
- в слизистой оболочке и подслизистом слое желудочно-кишечного тракта (76%) – в основном в процесс вовлечена тонкая кишка [4];
- гораздо реже венозные мальформации затрагивают другие органы: центральную нервную систему (13%) [14], глаза, почки, легкие, мочевой пузырь, мышцы, брюшину и плевру, а также кости [4].

В большинстве случаев эти образования выявляют уже при рождении/в младенчестве (30 и 9% случаев соответственно), но они могут появиться и гораздо позже (в 48% случаев) [14]; имеют голубой цвет, легко сжимаемы при пальпации. Размер этих голубых «каучуковых» образований варьирует от булавочной головки до нескольких сантиметров в диаметре. Имеется тенденция к росту и увеличению их количества, особенно в период пубертата [15]. Образования могут быть весьма болезненными [16]. Нет корреляции между количеством образований на коже и степенью поражения слизистой желудочно-кишечного тракта [4].

Пациенты с BRBNS, как и с другими венозными мальформациями, могут развивать коагулопатию потребления со снижением фибриногена и повышением уровня Д-димера [16, 17], но один из основных клинических симптомов этого заболевания – острые

или хронические кровотечения из множественных венозных мальформаций, локализованных в желудочно-кишечном тракте, которые неизбежно приводят к анемии. Острое кровотечение проявляется гематомезисом, меленой [18] или кровотечением из прямой кишки и служит основной причиной летального исхода [16]. Локализация венозных мальформаций в желудочно-кишечном тракте может привести к завороту кишок и развитию инфаркта [4].

Прогноз и лечение зависят от локализации образований, их количества и степени поражения внутренних органов [14].

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Родители дали согласие на использование персональных данных в клинических исследованиях и публикациях. Пациентка Д., 5 лет, в 2016 году поступила в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (далее – НМИЦ ДГОИ) с жалобами на выраженную слабость, бледность. Из анамнеза известно, что в возрасте 2 мес. девочке удалили «кавернозную гемангиому» мягких тканей головы и левой ушной раковины. Впервые снижение гемоглобина было отмечено у ребенка в возрасте 2 лет – 74 г/л; (минимальное снижение – до 46 г/л). В период с 2012 по 2016 год ребенок наблюдался у гематолога с диагнозом «железодефицитная анемия» (сывороточное железо – 2,2 мкмоль/л; ферритин – 7 мкг/л); наследственная форма гемолитической анемии (мембранопатия?). Периодически получала препараты железа – с кратковременным эффектом.

Впервые обратились в поликлинику НМИЦ ДГОИ в феврале 2014 года (в возрасте 3 лет) в связи со снижением уровня гемоглобина на фоне приема препаратов железа. При первичном обследовании выявлена гипохромная регенераторная

Рисунок 3

Внешний вид образования: сосудистое, синюшного цвета, выступающее над поверхностью кожи в области левой голени (фотография ребенка предоставлена с согласия родителей)



железодефицитная анемия: эритроциты – $2,8 \times 10^{12}/л$ (норма $4,2-4,6 \times 10^{12}/л$); Hb – 60 г/л (115–138 г/л); HCT – 21,8% (31–40%); MCV – 76,5 фл (75–100 фл); MCH – 21,1 пг (25–33 пг); MCHC – 275 г/дл (322–329 г/дл); ретикулоциты – 32‰; железо – 2,27 мкмоль/л. По данным ультразвукового исследования органов брюшной полости: незначительное увеличение селезенки. Назначена терапия препаратами железа, которые ребенок получал нерегулярно.

В связи с сохраняющейся анемией в январе 2015 года пациентке (в возрасте 4 лет) проведено дополнительное обследование – пункция костного мозга со стандартным цитогенетическим исследованием: патологических изменений не выявлено.

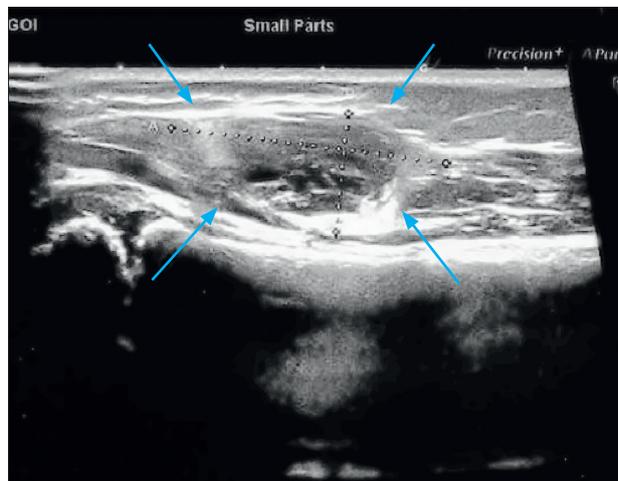
В январе 2016 года девочка (5 лет) повторно консультирована в поликлинике НМИЦ ДГОИ и госпитализирована в стационар в связи со снижением уровня гемоглобина до 63 г/л.

При госпитализации выявлены следующие изменения:

- анемический синдром (утомляемость, сниженный аппетит, бледность кожи, систолический шум над областью сердца);
- единичные сосудистые образования: на передней поверхности левой голени и стопы; на левой боковой поверхности языка визуализировались мягкие, темно-синего цвета «сосудистые образования» размером $0,8 \times 0,5$ см, легко сжимаемые (рисунок 3); в толще мягких тканей левого плеча пальпировалось плотное образование до 1 см в диаметре. На наружной поверхности левой ушной раковины, теменной области волосистой части головы – рубцы в местах иссечения «сосудистых образований»;
- увеличение размеров селезенки (+1,5–2 см из-под края реберной дуги).

Рисунок 4

Ультразвуковое исследование образования в толще дельтовидной мышцы левого плеча: овальное образование неоднородной структуры размером $39 \times 12 \times 18$ мм, с усиленным кровотоком



При обследовании выявлена железодефицитная анемия: Hb – 80 г/л (норма 115–138 г/л); RBC – $3,13 \times 10^{12}/л$ (норма $4,2\text{--}4,6 \times 10^{12}/л$); MCHC – 262 г/л (норма 322–368 г/л); ретикулоциты – 57‰; концентрация железа в сыворотке крови – 3,9 мкмоль/л (норма 9–21,5 мкмоль/л). Отмечено также снижение содержания сывороточного иммуноглобулина G – 3,53 г/л (норма 6,8–15,4 г/л). Анализ кала на скрытую кровь – положительный.

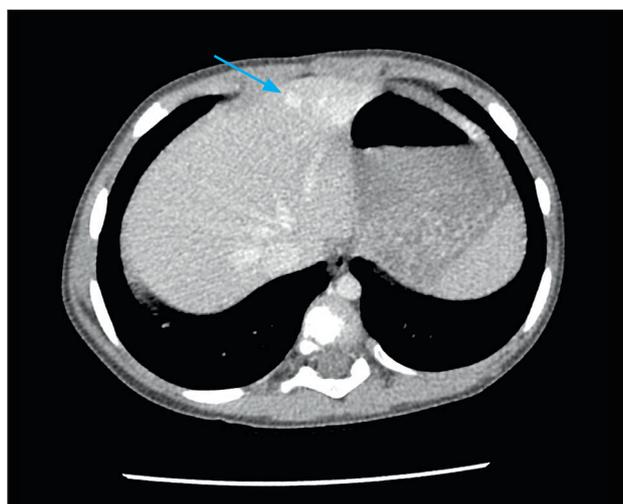
По данным ультразвукового исследования выявлены очаговые изменения в печени и толще дельтовидной мышцы левого плеча (образование овальной формы, неоднородной структуры, размером $39 \times 12 \times 18$ мм, с усиленным кровотоком) (рисунок 4); незначительная спленомегалия. Компьютерная томография с контрастным усилением органов брюшной полости подтвердила наличие гиперваскулярного образования в S3 левой доли печени размером до 8 мм (рисунок 5).

По данным магнитно-резонансной томографии головного мозга с контрастным усилением: в области спинки языка справа прослеживается объемное образование с четкими ровными контурами, высоким сигналом на STIR и T2 ВИ, низким – на T1, с интенсивным накоплением контрастного препарата. Размер образования – $1,9 \times 1,3 \times 0,8$ см. Подобное образование определяется в мягких тканях черепа в лобно-затылочной области, размер – $1,7 \times 0,6 \times 1,4$ см.

Для подтверждения диагноза ребенку выполнена видеокапсульная эндоскопия (НЦЗД РАМН): выявлены венозные мальформации слизистой оболочки подвздошной кишки с кровоизлияниями на поверхности (рисунок 6); активное тонкокишечное кровотечение.

Рисунок 5

Компьютерная томография печени: гиперваскулярное образование размером 8 мм в третьем сегменте левой доли печени



Проведена диагностическая ангиография, по результатам которой в паренхиме печени выявлены четыре гиперваскулярные образования (три – в правой доле, одно – в левой) с задержкой выведения рентгеноконтрастного вещества из образований в правой доле печени в венозной фазе. В тонкой кишке в конце капиллярной и венозной фаз определялись единичные участки накопления рентгеноконтрастного средства (РКС) небольших размеров.

По данным пересмотра гистологических препаратов, выполненных по месту жительства, подтвержден диагноз «венозная мальформация кожи» (рисунки 7–9). Иммуногистохимическое исследование не является необходимым для постановки данного диагноза.

Таким образом, по результатам проведенного обследования ребенку был поставлен диагноз «венозная мальформация, синдром Бина». Специфическая терапия препаратом сиролimus (рапамин) в дозе 0,1 мг/кг/сут под контролем концентрации препарата в крови (целевая концентрация препарата – 5–15 нг/мл) начата 13.05.2016.

На фоне комбинированной, специфической (рапамин) и сопроводительной терапии (препараты железа в дозе 5 мг/кг/сут через 1 мес. от начала терапии рапамин) Hb повысился до 139 г/л. Исчезла потребность в заместительных трансфузиях эритроцитной взвеси (за весь период наблюдения проведено 7 трансфузий, последняя – 12.05.2016) (рисунок 10). У ребенка улучшилось самочувствие, повысились аппетит и активность, отмечена прибавка в массе тела.

Через 7 мес. от начала терапии рапамин (03.11.2016) и через 2 года от начала терапии (02.08.2018) выполнена контрольная видеокапсульная эндоскопия: отмечена положительная

Рисунок 6

Слизистая кишечника: венозная мальформация с активным поверхностным кровотечением



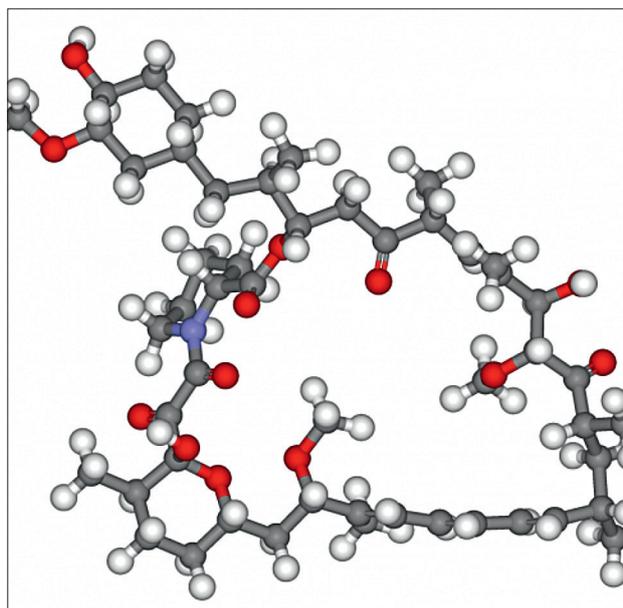
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты с синдромом Бина – это достаточно гетерогенная группа (по степени вовлечения висцеральных органов), требующая мультидисциплинарного подхода с участием педиатров, гастроэнтерологов и хирургов. На сегодняшний день нет четких рекомендаций по ведению пациентов с синдромом Бина, нет куративного метода лечения. Ангиомы очень сложно лечить. Применяют различные методы лечения и подходы. В качестве терапевтической опции используют так называемые антиангиогенные препараты – альфа-интерферон, кортикостероиды, пропранолол, октреопид [14, 17, 19–22]. Сосудистые мальформации, такие как синдром Бина, рассматривают как непролиферативные состояния, которые не должны отвечать на лекарственные препараты, а значит, должны быть удалены хирургическими методами, например, резекцией пораженного отдела кишки [23] или при помощи лазера/фотокоагуляции пораженных участков кожи. Очевидно, что все вышеперечисленные методы лечения носят симптоматический характер и не предотвращают развитие рецидивирующих кровотечений из других, вновь образованных участков сосудистой мальформации [19, 24, 25], либо, как в случае терапии преднизолоном, альфа-интерфероном, пропранололом, приводят лишь к временному успеху – при их отмене вновь возобновляются кровотечения [19, 20].

Более 20 лет L.M. Voon и M. Vikkula изучают сосудистые мальформации, пытаясь выяснить генетические механизмы, лежащие в основе патологического формирования сосудов. Изучение патогенеза данного заболевания позволило расширить

Рисунок 12

Молекула сиролимуса (рапамицина)



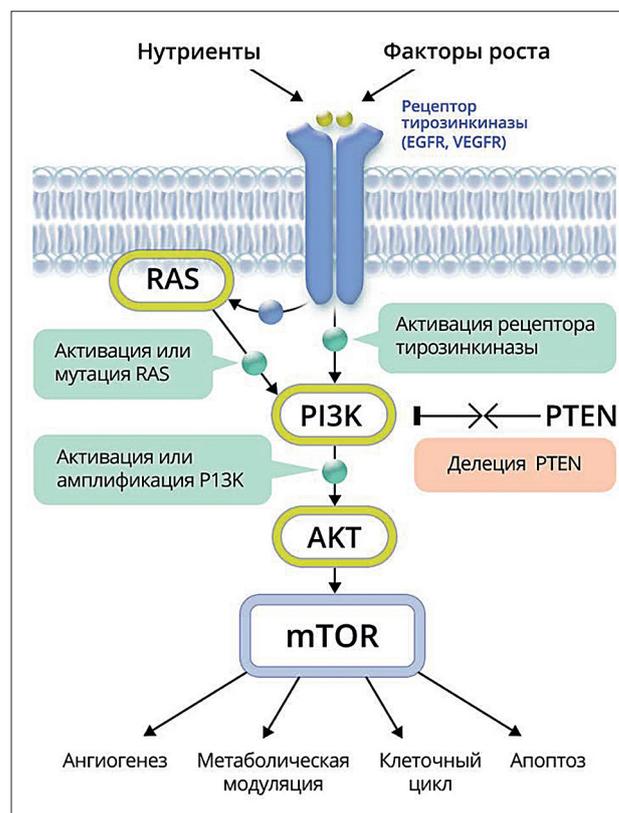
понимание сути заболевания. Было показано, что у пациентов с синдромом Бина эндотелиальные клетки в мелких венозных сосудах экспрессируют рецептор к фактору роста стволовых клеток c-kit, тирозинкиназу, активизирующую mTOR-путь. Это может объяснять ответ, наблюдаемый при использовании блокатора серин/треонин внутриклеточной киназы – рапамицина. В последнее время этот препарат все чаще используют не только при различных опухолях, но и при сосудистых мальформациях [26]. Известно, что пациенты, которые не ответили на многочисленные терапевтические опции и хирургические вмешательства, успешно отвечают на терапию рапамицином [19, 20, 24, 25, 27].

Рапамицин – природный антибиотик из семейства макролидов (рисунок 12), продуцируемый *S. hygroscopicus*. Более 30 лет назад это соединение было открыто на острове Rapa Nui (Чили). Первоначально его рассматривали как препарат с противогрибковой активностью, а в дальнейшем начали применять в качестве иммуносупрессивного средства у пациентов в посттрансплантационном периоде. Более поздние исследования показали, что данное соединение обладает еще и цитостатическим действием.

Сиролимус (рапамицин) действует на mTOR-фермент (*mammalian target of rapamycin*) – серин/треонин внутриклеточную киназу, которая относится к семейству PI3Ks (PI3K-киназа); mTOR

Рисунок 13

Схема PI3K/Akt/mTOR-пути [29]



участвует в регуляции многих процессов – в управлении «нутритивным снабжением» клетки (стимулирует рост клетки, активирует синтез белка, подавляет его деградацию), апоптозе, а также регуляции механизмов ангиогенеза, включающего в себя путь VHL/HIF [28]. Этот фермент играет ключевую роль в координации «нутритивных и ростовых» сигналов, поступающих в клетку извне. Его активность связана с сигнальным путем PI3K/AKT, который включается при передаче сигнала от мембранного рецептора, активирующего тирозинкиназу (рисунки 13). Повреждения сигнального пути PI3K/AKT/mTOR были описаны при многих опухолях. Изучение онкогенеза позволило понять, что это ключевой белок, который участвует в развитии опухоли, когда сигнальный путь PI3K/AKT амплифицирован:

- при активации мембранного рецептора тирозинкиназы (в частности, EGFR);
- при мутации RAS;
- при потере PTEN-негативной регуляции PI3K/AKT.

Сиролимус инактивирует mTOR, преодолевая влияние PI-3-Akt-сигнального пути на рост и выживание клетки. Многочисленные международные сообщения показали преимущества сиролимуса в качестве хорошо переносимой терапии у пациентов с сосудистыми аномалиями. Akt стимулирует увеличение размеров клеток с участием TOR. Связывание фактора роста с RTK активирует сигнальный путь с участием PI-3-киназы-Akt. Затем Akt непрямым способом активирует TOR (фосфорилируя и ингибируя белок, помогающий держать TOR выключенным). TOR, будучи серин/треонинкиназой, стимулирует синтез белков и подавляет их деградацию (фосфорилируя ключевые белки, участвующие в этих процессах). Рапамицин замедляет рост и размножение клеток, ингибируя TOR (свое название белок TOR получил благодаря тому, что служит мишенью для рапамицина).

В 2011 году *M. Adams* и соавт. опубликовали результаты терапии 6 пациентов с сосудистыми аномалиями (1 пациент – с синдромом Казабаха-Мерритт; 4 – с лимфатической мальформацией и 1 пациент – с капиллярной лимфатико-венозной мальформацией). Все пациенты получали терапию препаратом рапамицин в период с 2007 по 2010 год в дозе 1,6 мг/м²/сут с концентрацией препарата в крови 10–15 нг/мл. У всех пациентов был достигнут ответ на терапию, который характеризовался улучшением клинического статуса – купированием осложнений (выпотные плевриты, болевой синдром, двигательные расстройства), стабилизацией болезни (в частности, литических очагов), нормализацией

показателей гемограммы и коагулограммы. Ответ был достигнут в среднем через 2–3 недели [1].

В 2012 году *H. Yuksekkaya* и соавт. впервые опубликовали сообщение об успешном случае применения рапамицина у пациента с синдромом Бина [19]. В 2016 году *R. Salloum* и соавт. [16] опубликовали результаты терапии препаратом рапамицин у 4 пациентов с синдромом Бина. У всех пациентов были отмечены множественные венозные мальформации кожи и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, которые сопровождалась развитием хронической анемии, а у 3 пациентов еще и болевым синдромом; у одного пациента отметили коагулопатию с пограничной тромбоцитопенией. Ранее проводимое лечение хирургическими методами было неэффективно. После назначения рапамицина в дозе 1,6 мг/м²/сут (целевая концентрация – 10–13 нг/мл) в среднем через 6 недель достигался ответ на терапию в виде уменьшения размера образований, купирования болевого синдрома и достижения независимости от трансфузионной терапии, нормализации количества фибриногена. Длительность терапии у 3 пациентов составила 4 года.

H. Yuksekkaya (2012) [19], *B. Warner* (2015) [24], *L. Ferrés-Ramis* (2015) [25], *H. Cardoso* (2016) [27], *B. Özgönel* (2015) [30], *A. Ünlüsoy* (2017) [20] сообщили об успешном опыте применения рапамицина у пациентов с синдромом Бина. В каждой статье описан опыт применения препарата у одного пациента. Средний возраст пациентов составил 13,5 года (от 8 лет до 19 лет). Всем пациентам было проведено лечение, предшествующее рапамицину: хирургическое удаление (в том числе резекция пораженного участка кишки), склеротерапия, лазерная абляция, а также терапия преднизолоном, пропранололом, талидомидом, препаратами железа, заместительная терапия препаратами крови. Лечение этими методами было неэффективным или имело лишь временный эффект. После назначения терапии рапамицином (доза – 1,6 мг/м² или 0,1 мг/кг/сут) с достижением концентрации в крови в диапазоне 6–13 нг/мл в среднем через 3 мес. отмечали нормализацию Hb, уменьшение размера и количества сосудистых элементов на коже, в мягких тканях. Максимальный период наблюдения составил 23 мес.

После многочисленных клинических исследований было показано, что рапамицин позволяет (*M. Vikkula* и соавт.):

- сократить размеры образований более чем на 15%;
- значительно уменьшить болевой синдром;
- купировать кровотечения, которые происходят при некоторых формах венозных мальформаций, затрагивающих слизистые полых органов.

Благодаря длительному применению рапамицина в качестве иммуносупрессивной терапии у пост-трансплантационных пациентов хорошо известен спектр побочных эффектов, которые носят дозозависимый характер [26]; наиболее частые среди них – диарея, мукозит, тромбоцитопения, нейтропения, гиперлипидемия, гипергликемия; реже встречаются интерстициальная пневмония, периферические отеки. В ранее цитируемых статьях [16, 19, 20, 24, 25, 27, 30] отмечены такие побочные эффекты, как нейтропения, тромбоцитопения, незначительно выраженные (1–2-я степень) мукозиты, у одного пациента – повышение уровня холестерина в крови. Временная отмена препарата или снижение дозы позволяют купировать побочные эффекты, а в дальнейшем избегать их при назначении более низких доз. Опубликованы работы, в которых показано, что назначение рапамицина в субтерапевтических дозах с концентрацией препарата в крови 1–5 нг/мл, позволяет контролировать болезнь [30]. Использование минимально эффективной дозы может минимизировать побочные эффекты. Дозы рапамицина также должны быть сокращены при поражении почек, развитии инфекционного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный клинический случай показывает длинный, сложный путь постановки диагноза. Тщательный сбор анамнеза и внимательный клинический осмотр в большинстве случаев позволяют расставить приоритеты при выборе дополнительных исследований, которые помогут верифицировать диагноз. При наличии железодефицитной анемии у пациентов любого возраста необходимо прежде всего помнить о самой частой ее причине – хронических повторных кровопотерях, наиболее частый источник которых – желудочно-кишечный и мочеполовой тракты. Даже скрытые (окультированные) кровотечения на протяжении длительного времени могут привести к тяжелому дефициту железа. Ретикулоцитоз, который был выявлен у нашей пациентки при обследовании, не противоречит диагнозу «железодефицитная анемия» и является лишь отражением продолжающегося кровотечения.

Ситуация, при которой у ребенка выявляли множественные венозные мальформации кожи, мягких тканей и слизистой оболочки ротовой полости, длительный анамнез железодефицитной анемии, требующей заместительной трансфузионной терапии, позволили предположить, что у ребенка имеет место мультифокальная венозная мальформация с поражением слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, характерная для синдрома Бина. Оптимальным методом исследования было проведение видео-

капсульной эндоскопии, которая в совокупности с данными гистологического исследования подтвердила данный диагноз.

Терапия рапамицином позволила приостановить патологический процесс ангиогенеза и даже уменьшить проявления ранее выявляемых образований. Кроме того, хорошая переносимость этого препарата позволяет контролировать основные проявления заболевания и значительно улучшать качество жизни.

Несмотря на достаточно большой опыт применения рапамицина, приобретенный за последние 5–8 лет, остается очень много вопросов. Эффективен ли рапамицин при других формах сосудистых аномалий? Может ли он предотвратить развитие новых сосудистых образований? Какова оптимальная продолжительность терапии? Какова динамика заболевания после прекращения приема препарата? К сожалению, на сегодняшний день нет четких рекомендаций по длительности терапии рапамицином. Возможно, период терапии может быть ограничен пубертатом, после становления которого отмечено более «спокойное» течение заболевания с минимальным появлением новых сосудистых образований. Необходимы перспективные исследования для оценки долгосрочных эффектов данного препарата у этой категории пациентов. Более глубокий анализ этого синдрома на геномном уровне, несомненно, поможет идентифицировать дополнительные таргетные подходы. А пока можно точно утверждать, что терапия рапамицином значительно улучшает качество жизни пациентов – как детей, так и взрослых, страдающих венозными мальформациями.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Hachatryan L.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7265-0414>

Kletskaya I.S. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8552-7682>

Литература

- Hammill A.M., Wentzel M., Gupta A., Nelson S., Lucky A., Dasgupta R., et al. Sirolimus for the treatment of complicated vascular anomalies in children. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 1018–24.
- Wassef M., Enjolras O. Superficial vascular malformations: classification and histopathology. *Ann Pathol* 1999; 19: 253–64.
- Domp Martin A., Acher A., Thibon P., Tourbach S., Hermans C., Deneys V., et al. Association of localized intravascular coagulopathy with venous malformation. *Arch Dermatol* 2008; 144: 873–7.
- Casanova D., Boon L.M., Vikkula M. Les malformation veineuses: aspects cliniques et diagnostic différentiel. *Annales de chirurgie et plastique esthétique* 2006; 51: 373–87.
- Vikkula M., Boon L.M., Carraway K.L., Calvert J.T., Diamonti A.J., Goumnerov B., et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996; 87: 1181–90.
- Bean W.B. Blue rubber-bleb nevi of the skin and gastrointestinal tract. In: Bean WB. *Vascular Spiders and Related Lesions of the Skin*. Springfield, IL: Charles C Thomas 1958: 17–185.
- Martinez C.A., Rodrigues M.R., Sato D.T., Junior P.P., Gama R.F., Mattavelli C.B., et al. Blue rubber bleb nevus syndrome as a cause of lower digestive bleeding. *Case Rep Surg* 2014; 683684: 1–4.
- Deshpande G.A., Samarasam I., George S.V., Chandran S. Blue rubber bleb nevus syndrome: a rare cause of chronic gastrointestinal bleed in adults. *Singapore Med J* 2014; 55: e1175–e1176.
- Brahmi N., Aribi M., Sari B.-E., Van Kien P.K., Touitou I., Lefranc G., Barathouari M. Lack of TEK Gene Mutation in Patients with Cutaneomucosal Venous Malformations from the North-Western Region of Algeria. *Genet Res Int* 2013; 2013: 784–9.
- Boon L.M., Mulliken J.B., Vikkula M., Watkins H., Seidman J., Olsen B.R., Warman M.L. Assignment of a locus for dominantly inherited venous malformations to chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 1994; 3 (9): 1583–7.
- Soblet J., Kangas J., Natynki M., Mendoza A., Helaers R., Uebelhoer M., et al. Boon and Miikka Vikkula (2017). Blue rubber bleb nevus (BRBN) syndrome is caused by somatic TEK (TIE2) mutations. *Journal of Investigative Dermatology* 2017; 137: 207–16.
- Blind A.M., Vabres P., Carmignac V., Duffourd Y., Mahé A. Malformations veineuses liées à des mutations du gene TEK: illustration d'un continuum Clinique et génétique à partir d'un cas de syndrome de Bean. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 2017 Dec; 144 (12, Suppl), S243–4.
- Eterm D., Acar Y., Kotilogu E., Yucelten D., Pehlivanoglu E. Blue rubber bleb nevus syndrome. *Pediatrics* 2001; 107: 418–20.
- Jin X.L., Wang Z.H., Xiao X.B., Huang L.S., Zhao X.Y. Blue rubber bleb nevus syndrome. A case report and literature review. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 17254–9.
- Oranje A.P. Blue rubber bleb nevus syndrome. *Pediatr Dermatol* 1986; 3: 304–10.
- Salloum R., Fox C.E., Alvarez-Allende C.R., Hammill A.M., Dasgupta R., Dickie B.H., et al. Response of Blue rubber bleb nevus syndrome to Sirolimus treatment. *Pediatr Blood Cancer* 2016 Nov; 63 (11): 1911–4.
- Apak H., Celkan T., Ozkan A., Yidiz I., Aydermir E.H., Ozdil S., Kuruoglu S. Blue rubber bleb nevus syndrome associated with coagulopathy: Treatment with interferon. *Dermatology* 2004; 208: 345–8.
- Fishman S.J., Burrows P.E., Leichter A.M., Mulliken J.B. Gastrointestinal manifestations of vascular anomalies in childhood: varied etiologies require multiple therapeutic modalities. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1163–7.
- Yuksekkaya H., Ozbek O., Keser M., Toy H. Blue rubber bleb nevus syndrome: successful treatment with sirolimus. *Pediatrics* 2012; 129 (4): 1080–4.
- Ünlüsoy Aksu A., Sari S., Eçritas Gürkan Ö., Dalgıç B. Favorable response to Sirolimus in a child with Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome in the Gastrointestinal tract. *J Pediatric Hematology/Oncology* 2017; 39 (2): 147–9.
- Deng Z.H., Xu C.D., Chen S.N. Diagnosis and treatment of blue rubber bleb nevus syndrome in children. *World J Pediatr* 2008; 4: 70–3.
- Dobru D., Seuceha N., Dorin M., Careianu V. Blue rubber bleb nevus syndrome: a case report and literature review. *Rom J Gastroenterol* 2004; 13: 237–40.
- Fishman S.J., Smithers C.J., Folkman J., Lund D.P., Burrows P.E., Mulliken J.B., Fox V.L. Blue rubber bleb nevus syndrome: Surgical eradication of gastrointestinal bleeding. *Ann Surg* 2005; 241: 523–8.
- Warner B., Butt A., Cairns S. Sirolimus is a successful treatment for recurrent iron deficiency anaemia in Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2015; 60 (6): 49–50.
- Ferrés-Ramis L., Knöpfel N., Salinas-Sans J.A., Martín-Santiago A. Rapamycin in the treatment of Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome. *Atlas Dermofisiologr* 2015; 106: 137–8.
- Hammill A.M., Wentzel M., Gupta A., Nelson S., Lucky A., Elluru R., et al. Sirolimus for the treatment vascular anomalies in children. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 1018–24.
- Cardoso H., Dias J.A., Silva M., Vilas-Bas F., Trindade E., Tavares M., Macedo G. Successful treatment with sirolimus of a patient with Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome. *J. of Gastroenterology and Hepatology* 2016; 31 (3): 519.
- Neuhaus P., Klupp J., Langrehr J.M. mTOR inhibitors: An overview. *Liver Transpl* 2001; 7: 473–84.
- Soria J.-C., Vignot S., Massard C., Mir O. Cours de chimiothérapie antitumorale et traitement médical du cancer. 2013: 182–5.
- Özgönel B., Martin A. Low-dose sirolimus controls recurrent iron deficiency in a patient with blue rubber bleb nevus syndrome. *Pediatric Blood Cancer* 2015; 62 (11): 20154–5.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 07.05.2019

Принята к печати 24.06.2019

Инвазивный аспергиллез у детей в дебюте острого миелобластного лейкоза

Ю.В. Диникина^{1,3}, О.В. Шадривова², М.Б. Белогурова^{1,3}, Н.Н. Дохина¹,
С.Н. Хостелиди², С.М. Игнатьева², Т.С. Богомолова², Н.Н. Клишко²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

² ФГБУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург

³ ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Минздрава России, Санкт-Петербург

Контактная информация:
Диникина Юлия Валерьевна, канд. мед. наук, заведующая отделением химиотерапии онкогематологических заболеваний и ТКМ для детей НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России.
Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2
E-mail: dinikina_yuv@almazovcentre.ru

Инвазивный аспергиллез (ИА) – угрожающее жизни осложнение у детей с онкогематологическими заболеваниями. Риск развития ИА наиболее высок у больных с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). В статье представлен случай успешного лечения ИА в дебюте ОМЛ у пациента с синдромом Дауна, а также анализ ИА у детей с ОМЛ по данным регистра и обзор литературы. Общее число пациентов – 46, из них с ОМЛ – 16 (34,7%); ИА диагностировали в дебюте ОМЛ у 3 (18,75%) пациентов. Факторами риска развития ИА были длительный агранулоцитоз (100%) и лимфоцитопения (81%). Основные клинические проявления: повышение температуры тела выше 38,5 °С (93,7%), кашель (75%) и дыхательная недостаточность (43,7%). Поражение легких отмечено у 93,7% больных; более двух очагов поражения – у 12,5%; эндофтальмит – у 6,25%. На основании результатов обследования «вероятный» ИА был диагностирован у 87,5%, «доказанный» – у 12,5% больных. Антимикотическую терапию получили 100% пациентов, монотерапию вориконазолом – 50%, комбинацию антимикотиков – 33,3%. Общая 12-недельная выживаемость составила 87,5%. Родители дали согласие на использование информации в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: инвазивный аспергиллез, дети, онкогематология, острый лейкоз, антифунгальная терапия

Диникина Ю.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 88–95.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-88-95

© 2019 by NMRC PHOI

Received 07.05.2019

Accepted 24.06.2019

Invasive aspergillosis in children in debut of acute myeloid leukemia

Y.V. Dinikina^{1,3}, O.V. Shadrivova², M.B. Belogurova^{1,3}, N.N. Dokhina¹, S.N. Khostelidi², S.M. Ignatyeva²,
T.S. Bogomolova², N.N. Klimko²

¹ Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 1/28 Santyago-de-Kuba str., Saint-Petersburg

³ St. Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Litovskaya str., Saint-Petersburg

Invasive aspergillosis (IA) is a life-threatening complication in pediatric patients with hematological malignancies. The highest incidence rates of IA were found in pediatric patients with acute myeloid leukemia (AML). We presented a case of successful treatment of IA in a patient with debut of AML with Down syndrome, analysis of IA cases in children with AML according data of the register and a literature review. 46 pediatric patients with IA were included, among them 16 (34.7%) with AML. In 3 (18.75%) pts AML was diagnosed in presentation of AML. Risk factors of IA were prolonged neutropenia (100%) and lymphocytopenia (81%). The most common clinical signs were: fever > 38.5 °C (93.7%), cough (75%) and respiratory failure (43.7%). The lung involvement was diagnosed in 93.7% of pts, more than 2 sites of IA – in 12.5%, endophthalmitis – in 6.25%. Typical imaging finding was «halo sign» – 37.5%. According received results «probable IA» was diagnosed in 87.5% of pts and «proven» in 12.5%. Antifungal treatment received 100% of patients, with voriconazole only – 50%, combined antifungal therapy – 33.3%. Overall 12-week survival was 87.5%. Parents patients agreed to use personal data in research and publications.

Key words: invasive aspergillosis, children, oncohematology, acute leukemia, antifungal therapy

Dinikina Y.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2019; 18 (3): 88–95.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-88-95

Correspondence:
Yulia V. Dinikina MD, PhD, Head of the Department of pediatric oncohematology and SCT Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg.
Address: Russia, 197341, St. Petersburg, Akkuratova st., 2
E-mail: dinikina_yuv@almazovcentre.ru

Инвазивный аспергиллез (ИА) – осложнение, угрожающее жизни, у детей с онкогематологическими заболеваниями. Наиболее высок риск развития ИА у больных с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Мы приводим описание случая успешного лечения ИА в дебюте ОМЛ у пациента с синдромом Дауна.

Проведен анализ данных регистра больных ИА за период с 1997 по 2018 год: 46 детей в возрасте от 0 до 18 лет, в том числе 16 (34,7%) пациентов с ОМЛ, получавших противоопухолевую терапию без использования трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК); 21 (45,6%) – с другими гемобластозами и 9 (19,5%) больных с солидными опухолями.

Выполнен анализ данных литературы по особенностям ИА у детей как в дебюте заболевания, так и в период постцитостатической иммуносупрессии. Для постановки диагноза ИА использовали критерии Европейской организации по исследованию и лечению рака (EORTC/MSG, 2008). С диагностической целью выполняли компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки (ОГК) в режиме высокого разрешения, фибробронхоскопию (ФБС) с забором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и последующими микроскопическим, культуральным и серологическим исследованиями. Наличие галактоманна (ГМ) в сыворотке крови и БАЛ определяли иммуноферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы PLATELIA® *Aspergillus* (BIO-RAD Laboratories, США). Диагностически значимым считали индекс оптической плотности (ИОП) более 0,5 в сыворотке крови и более 1,0 – в БАЛ.

Описание клинического случая

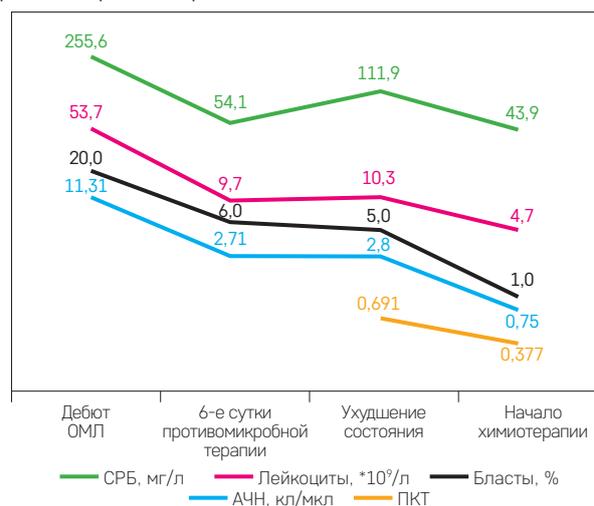
Мальчик, 16 мес., был госпитализирован в отделение химиотерапии онкогематологических заболеваний для детей НМИЦ им. В.А. Алмазова в тяжелом состоянии. Родители дали согласие на использование персональных данных в клинических исследованиях и публикациях. Фоновое заболевание: острый мегакариобластный лейкоз с коэкспрессией CD7. Сопутствующая патология: синдром Дауна (кариотип 47XY +21). Дебют острого лейкоза – 3 мес. назад в виде нейтропении 3–4-й степени, тромбоцитопении 2–3-й степени и кожно-геморрагического синдрома. Из анамнеза известно, что в первый год жизни ребенок перенес пневмонию неverified этиологии, частые острые респираторные вирусные инфекции. Вакцинацию по возрасту не проводили.

При поступлении: жалобы на слабость, снижение массы тела, кожно-геморрагический синдром, фебрильную лихорадку, одышку. В гемограмме выявили

анемию 4-й степени, тромбоцитопению 2-й степени, лейкоцитоз – $53,7 \times 10^9/\text{л}$, бласты – 27%, АЧН – $11,3 \times 10^9/\text{л}$. Уровень С-реактивного белка (СРБ) – 255,62 мг/л (рисунок 1). С учетом тяжести состояния, обусловленной синдромом интоксикации и дыхательной недостаточностью (ДН) 2-й степени, проведение специфической терапии было отложено.

Рисунок 1

Динамика показателей гемограммы (лейкоциты, АЧН, бласты) и маркеров системного воспаления (СРБ, ПКТ) на фоне противомикробной терапии

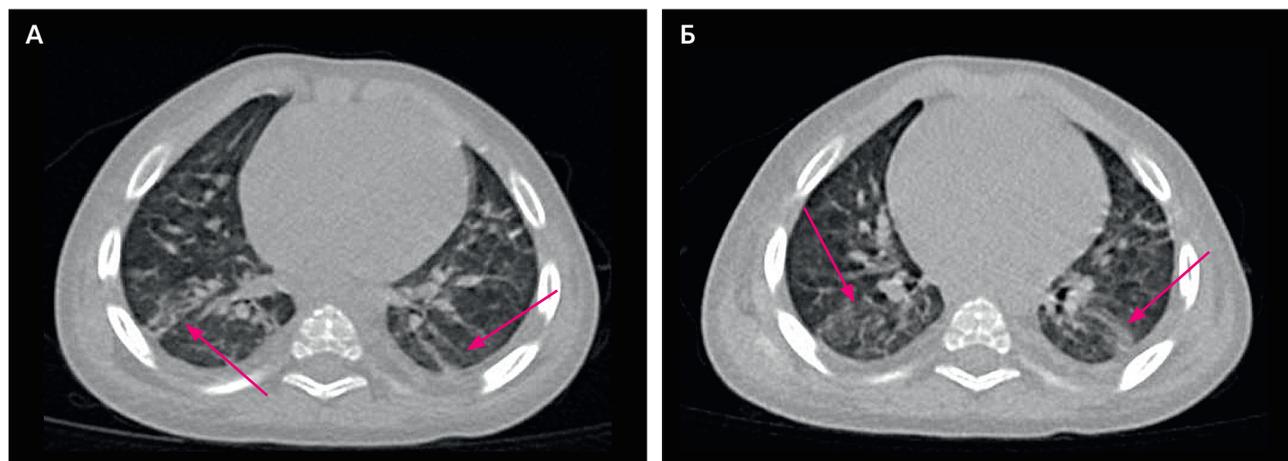


При обследовании на КТ ОГК выявили наличие очагов в обоих легких без четких контуров по типу «матового стекла» (рисунок 2). Выполнили диагностическую ФБС: диагноз «гнояный эндобронхит». По результатам исследования БАЛ выявили наличие смешанной вирусной инфекции: цитомегаловирус (ЦМВ) – $1,9 \times 10^3$ копий ДНК ЦМВ/ 10^5 клеток; вирус Эпштейна–Барр (ЭБВ) – $4,40 \times 10^1$ копий ДНК ЭБВ/ 10^5 клеток; вирус герпеса 6-го типа (ВГ6) – $3,70 \times 10^1$ копий ДНК ВГ6/ 10^5 клеток.

На фоне проведения эмпирической противомикробной терапии препаратами широкого спектра действия (меропенем, микафунгин, ганцикловир) в

Рисунок 2

КТ органов грудной клетки: дебют ОМЛ; в обоих легких – наличие очагов без четких контуров по типу «матового стекла»



течение 6 дней отмечали положительную динамику в виде увеличения интервалов апиреksии, снижения инициального лейкоцитоза, маркеров системного воспаления (рисунок 1). На 7-е сутки терапии состояние ухудшилось: учащение эпизодов фебрильной лихорадки, нарастание дыхательной недостаточности (зависимость от кислорода), двукратное нарастание уровня СРБ. При этом уровень прокальцитонина (ПКТ) был ниже 1 нг/мл, что определяло низкую вероятность течения тяжелой бактериальной инфекции (рисунок 1).

По данным повторной КТ ОГК выявили отрицательную динамику в виде появления инфильтративных полисегментарных изменений в обоих легких (рисунок 3). Получен положительный результат теста на галактотриптан в БАЛ (ИОП = 1,78). На основании проведенного обследования диагностировали двустороннюю полисегментарную пневмонию смешанной этиологии (инвазивный аспергиллез легких, ЦМВ, ВГ 6 типа, *Sternotrophomonas maltophilia*). По жизненным показаниям был назначен вориконазол в дозе 8 мг/кг, внутривенно, каждые 12 ч. При повторном исследовании БАЛ выявили снижение

количества копий ЦМВ (16,00 копий ДНК ЦМВ/10⁵ клеток), эрадикацию ЭВВ, ВГ6; повторно получили *Sternotrophomonas maltophilia* (со среды обогащения). Продолжили комбинированную противомикробную терапию (вориконазол, ганцикловир, ко-тримоксазол), отмечали положительную динамику в виде стойкой апиреksии, разрешения ДН, снижения маркеров системного воспаления, лейкоцитоза. Следует подчеркнуть, что после достижения инфекционного контроля, снижения лейкоцитоза и бластоза в периферической крови вновь была отмечена нейтропения 3-й степени.

Интервал от момента госпитализации до достижения инфекционного контроля и начала цитостатической химиотерапии составил 18 дней. Лечение фонового заболевания проводили согласно протоколу терапии ОМЛ при синдроме Дауна (*Myeloid Leukemia Down Syndrome 2006*) с достижением полной ремиссии. Терапию вориконазолом продолжали в течение всего периода противоопухолевой терапии и аплазии кроветворения до полного разрешения клинических и радиологических симптомов ИА (динамика данных КТ представлена на рисунке 4).

Рисунок 3

Рентгенография и КТ органов грудной клетки, дебют ОМЛ: отрицательная динамика на фоне комбинированной противомикробной терапии; признаки двусторонних полисегментарных инфильтративных изменений в легких

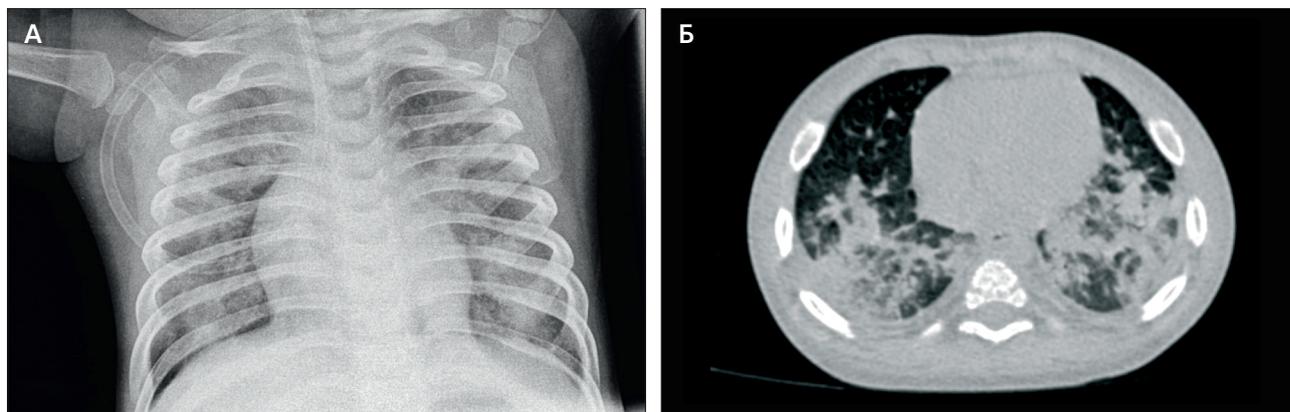
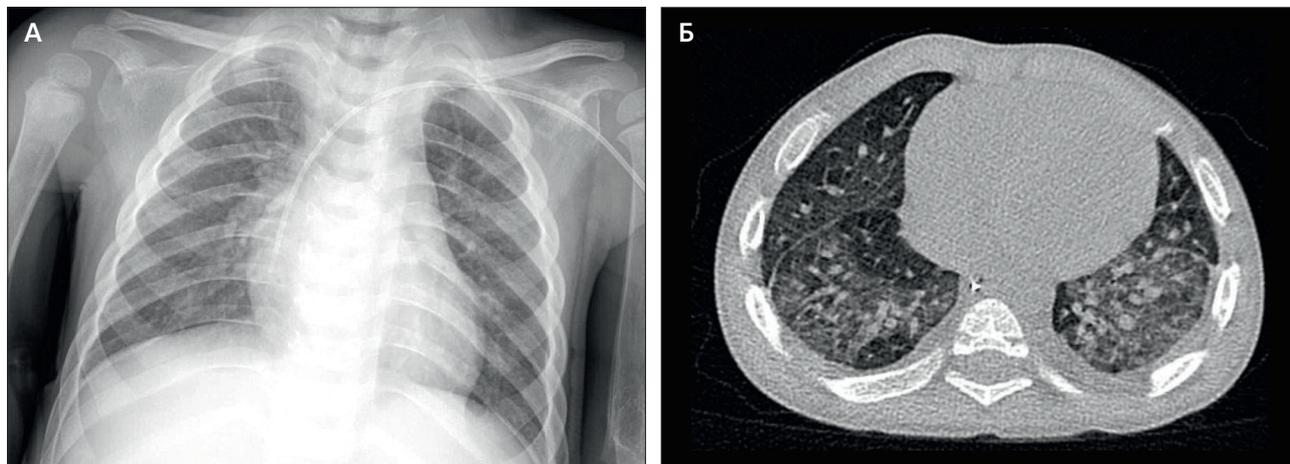


Рисунок 4

Рентгенография, КТ органов грудной клетки; 6 недель противогрибковой терапии: КТ-признаки остаточной инфильтрации, уплотнений по типу «матового стекла» в обоих легких



Анализ данных регистра больных ИА

Проанализированы данные 16 пациентов с ОМЛ, что составляет 34,7% от общей когорты больных ИА детей с онкологическими заболеваниями, получавших противоопухолевую терапию без использования ТГСК. Возраст пациентов – от 1 до 17 лет (медиана – 11 лет); соотношение мужского и женского пола – 1,6:1. В дебюте ОМЛ диагностировали ИА у 3 (18,75%) пациентов. Среднее число курсов химиотерапии до возникновения ИА – три. Анализ факторов риска показал, что агранулоцитоз наблюдали у 100% больных (медиана – 43,9 дня); лимфоцитопению – у 81,25% (медиана – 27,4 дня). У 2 (12,5%) пациентов в дебюте заболевания на момент диагностики ИА нейтропении не было. Однако в дальнейшем, после инициации специфической терапии, в постцитостатическом периоде у 100% пациентов развились агранулоцитоз и лимфоцитопения. В период постцитостатической аплазии кроветворения сопутствующая тяжелая бактериальная инфекция была зафиксирована у 37,5% больных, ЦМВ-болезнь – у 18,7%. Случаев пребывания в ОРИТ с проведением искусственной вентиляции легких не было.

Основными клиническими проявлениями ИА были повышение температуры тела выше 38,5 °C (93,7%) и кашель (75%). Дыхательная недостаточность развилась у 43,7% пациентов; поражение легких отмечено у 93,7% больных, более двух очагов поражения – у 12,5%, эндофтальмит – у 6,25%.

Для диагностики ИА у 93,7% больных использовали КТ ОГК в режиме высокого разрешения. Наиболее частым признаком был симптом «матового стекла» – у 37,5% больных. Микологическое исследование биосубстратов (БАЛ, смывы из брюшной полости) провели 50% больным, при этом рост *Aspergillus spp.* получен у 12,5% пациентов, в том числе выделены *A. fumigatus* и *A. niger* в равных долях (по 6,25%). Положительный результат теста на галактоманнан в БАЛ/сыворотке крови был получен у 92,8% пациентов. На основании результатов проведенного обследования «вероятный» ИА был диагностирован у 87,5% больных, «доказанный» (на основании гистологического исследования материала) – у 12,5%. Хирургическое вмешательство выполнено у 2 (12,5%) пациентов, в одном случае – с диагностической целью.

Антимикотическую терапию получали 100% пациентов, монотерапию вориконазолом – 50%, комбинацию антимикотиков – 33,3%. Хирургическое лечение (спленэктомия) применили у одного пациента с диссеминированным ИА. Общая 12-недельная выживаемость составила 87,5%.

Анализ литературных данных

ОМЛ у детей – редкое клональное заболевание, частота его возникновения составляет около 7 случаев на 1 млн детей младше 15 лет в год. При синдроме Дауна риск возникновения ОМЛ увеличивается в 14–20 раз [1, 2]. На сегодняшний день идентификация молекулярно-генетических факторов и особенностей патогенеза заболевания позволяет оптимизировать методы лечения. Риск-адаптированная полихимиотерапия с интенсификацией режимов в группах неблагоприятного прогноза позволила достичь 5-летней бессобытийной выживаемости (БВ) у 70% детей [2]. У пациентов с синдромом Дауна с учетом высокой чувствительности к химиотерапии [3] и благоприятного прогноза использование протоколов с редукцией доз с целью снижения токсичности и инфекционно-опосредованной летальности (ИОЛ) доказало свою эффективность (БВ > 85%) [2, 4].

ИОЛ у детей до начала специфической терапии и после индукционной химиотерапии требует изучения факторов риска и разработки стратегий снижения уровня летальности путем оптимизации методов диагностики и сопроводительного лечения [5]. По данным различных исследовательских групп, инфекционные осложнения – основная причина увеличения межкурсовых интервалов, сроков госпитализации пациентов и летальности [6–8].

По данным литературы, у детей с ОМЛ показатель ИОЛ варьирует от 1,5% [9] до 31% [6, 10, 11], что можно объяснить различиями в возрасте пациентов, используемых режимах химиотерапии и сопроводительного лечения. По данным группы VFM, у пациентов с синдромом Дауна ИОЛ составляет 4,9% [12].

Основные факторы риска развития инфекционных осложнений – возраст менее 5 и старше 16 лет, этническая принадлежность (не белая раса) [4], недостаточная или избыточная масса тела [6, 13], нейтропения до начала индукционной химиотерапии [3].

Инвазивные микозы (ИМ) – одна из основных причин летальности у пациентов с ОМЛ, при этом наиболее частые этиологические агенты – *Aspergillus spp.* (20–30%) и *Candida spp.* (15–50%) [6, 7, 14, 15]. По данным зарубежных авторов, частота ИА у пациентов с ОМЛ (4,0%) сопоставима с таковой у реципиентов аллогенной ТГСК (4,5%) [16]. *N. Crassard* и соавт. также указывают на высокую частоту ИА (5,4%) у детей с ОМЛ по сравнению с другими нозологиями [17]. По данным различных исследований, летальность при ИА у детей с онкогематологическими заболеваниями варьирует от 45 до 80% [18, 19]. При ОМЛ риск летальности выше по сравнению с другими нозологиями [20].

Оптимальная стратегия ведения пациентов с онкогематологическими заболеваниями в период

химиоиндуцированной нейтропении отражена в международных рекомендациях [21, 22]. Неопределенными остаются аспекты ведения пациентов с лихорадкой с нейтропенией и без нее в дебюте острого лейкоза (ОЛ): дифференциальная диагностика специфической и инфекционной лихорадки, объем обследования и противомикробной терапии, сроки начала противоопухолевой терапии [5].

В исследовании *C. Portwine* и *соавт.* продемонстрировано, что лишь у 28% пациентов с ОМЛ в дебюте заболевания имеет место нейтропения, при этом значительно реже – в когорте детей с синдромом Дауна. Авторы подчеркивают отсутствие достоверных различий между частотой инфекционных осложнений в дебюте ОМЛ и уровнем нейтрофилов [5]. Доля случаев фебрильной лихорадки неясного генеза до начала специфической терапии в группе пациентов с нейтропенией и без нее – 38 и 36,4% соответственно [5].

В других исследованиях показано, что нарушение функциональной активности нейтрофилов может играть определяющую роль в частоте инфекционных эпизодов в дебюте гематологического заболевания [23, 24]. У больных с ОЛ установлены нарушение антителозависимой цитотоксичности нейтрофилов, низкая способность клеток к фагоцитозу и миелопероксидазная недостаточность нейтрофилов и моноцитов, при этом изменения более выражены у пациентов с инфекционно-воспалительными проявлениями [25]. Известно, что фагоцитоз с активацией окислительного взрыва – один из основных механизмов противогрибковой защиты [26], неэффективность которого у пациентов с ОЛ определяет вероятность развития ИМ в отсутствие нейтропении [27]. Помимо нейтропении, развитию ИА способствуют следующие факторы: пребывание в отделении реанимации, тяжелый сепсис, острая почечная недостаточность, вирусная инфекция, факторы окружающей среды (загрязнение воздуха спорами плесневых грибов, особенности местожительства) [28].

Экспертные группы по изучению ИМ (ECIL [29], ESCMID-ECCM-ERS [30], IDSA [31]) подчеркивают необходимость комплексной диагностики с использованием клинических, радиологических и микробиологических методов.

Доминирующий клинический вариант ИА – поражение легких [32]. Клинические симптомы в большинстве случаев неспецифичны, что затрудняет проведение дифференциального диагноза с пневмонией другой этиологии [33]. Период от появления клинических симптомов до постановки диагноза ИА у детей составляет в среднем 11 дней [29].

Один из основных методов диагностики – КТ органов грудной клетки, специфичные проявления при этом – симптом «серпа» (2,2%), симптом «матового

стекла» (11%) и формирование полостей (24,5%) [34]. По данным нашего регистра, наиболее частыми КТ-признаками были симптом «матового стекла» наряду с инфильтративными изменениями – 37,5% и симптом «серпа» – 12,5%. Известно, что симптом «серпа» не характерен для пациентов с нейтропенией, но может появляться в периоде восстановления лейкопоза [15]. Дополнительным методом диагностики служит КТ-ангиография, которая позволяет диагностировать признаки сосудистой инвазии и окклюзии; чувствительность и специфичность этого метода – 0,94 и 0,71 соответственно [34]. Использование позитронно-эмиссионной томографии с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой не позволяет в полной мере дифференцировать ИА легких от других воспалительных очагов или метастатического поражения [35].

Получение биосубстратов для микробиологического исследований у пациентов с онкогематологическими заболеваниями может быть затруднено. Кроме того, длительный временной интервал до получения результатов посевов (3–14 дней) ведет к отсроченному назначению патогенетической терапии [19, 29–31]. Ввиду низкой диагностической чувствительности микроскопии и посева респираторных субстратов (20–50%) для выявления *Aspergillus* зачастую необходимо проведение повторных исследований [19, 36].

Один из диагностически значимых маркеров ИА – определение ГМ в биологических жидкостях (БАЛ, сыворотка крови) иммуноферментным методом. Как высокоспецифичный и чувствительный этот тест рекомендован к использованию у пациентов с онкогематологическими заболеваниями и нейтропенией в качестве ранней диагностики и мониторинга ответа на антифунгальную терапию [19]. Имеются данные о снижении чувствительности метода у пациентов без нейтропении и получавших антифунгальную профилактику в отношении плесневых грибов [19]. *C. Cordonnier* и *соавт.* выполнили исследование с целью определения корреляции уровня ГМ в сыворотке крови и числа нейтрофилов у пациентов с гематологическими заболеваниями [37]. Авторы подчеркивают, что получение отрицательного результата у пациента без нейтропении не исключает диагноза ИА и требует использования дополнительных методов диагностики. Оптимальные значения индекса оптической плотности в жидкости БАЛ у пациентов без нейтропении составляют 0,7 и $\geq 1,0$, а показатели чувствительности и специфичности – 72,97 и 89,16% соответственно, и по чувствительности превосходят таковые в сыворотке крови (37,84%; $p < 0,001$) [38]. Ложноположительные результаты теста могут быть обусловлены наличием других грибковых и бактериальных инфекций, использованием таких антибиоти-

ков, как пиперациллин/тазобактам или амоксициллин/клавуланат [15, 39].

Несмотря на достигнутые успехи в диагностике, лечении и профилактике ИА, уровень летальности у детей остается высоким. По данным *Children's Oncology Group* (Группа по изучению рака у детей) в исследовании CCG 2961 по лечению ОМЛ, частота возникновения ИА составила 13%, при этом уровень летальности колебался в пределах 15–57% в зависимости от фазы химиотерапии и степени иммуносупрессии [19]. По данным *Z.D. Papa и соавт.*, уровень летальности при ИА у детей составляет 10–70%; неблагоприятные факторы, влияющие на прогноз заболевания, – диссеминация инфекции, вовлечение ЦНС и длительно персистирующая нейтропения [40].

Использование первичной профилактики ИА у детей рекомендовано экспертами ESCMID-ECMM-ERS [30] и ECIL [29] в группах высокого риска: первичные формы или рецидивы ОЛ, синдромы костномозговой недостаточности, сопровождающиеся длительной нейтропенией (апластическая анемия, миелодиспластический синдром), реципиенты аллогенной ТГСК. Препараты выбора – вориконазол (> 2 лет) и позаконазол (> 13 лет) [19].

В соответствии с последними рекомендациями ESCMID-ECMM-ERS (2017) [30], ECIL [29], IDSA [31] препарат выбора для лечения ИА у детей старше 2 лет – вориконазол. Эксперты ECIL предлагают использовать терапевтический мониторинг ввиду высокого уровня элиминации препарата и фармакокинетической нестабильности [19, 29, 31]. Липосомальный амфотерицин В и каспофунгин – альтернативные препараты для лечения ИА у детей [30]. Для успешного исхода ИА необходимо своевременное начало этиотропного лечения, элиминация факторов риска, контроль основного заболевания и хирургическое удаление очага поражения при неэффективности консервативной терапии [29]. Антифунгальную терапию продолжают до исчезновения клинических признаков заболевания, эрадикации возбудителя, купирования или стабилизации радиологических признаков, а также завершения периода нейтропении и выраженной иммуносупрессии [19, 36]. Средняя продолжительность стартовой

терапии составляет 20 дней, до достижения ремиссии – 60 дней [36].

Необходимость вторичной антифунгальной профилактики в периоды сохраняющейся нейтропении и иммуносупрессии обусловлена высоким риском рецидивов ИМ, частота которых составляет 30–50% у пациентов с ОЛ и реципиентов аллогенной ТГСК [19]. Развитие ИА не должно препятствовать активному лечению фонового заболевания, при этом профилактику рецидива ИА следует проводить после достижения ремиссии при каждом последующем курсе цитостатической терапии, сопровождающейся агранулоцитозом или выраженной иммуносупрессией [43].

ВЫВОДЫ

В детской когорте больных ИА пациенты с ОМЛ, получающие комбинированную химиотерапию, составляют 34,7%. Среди факторов риска – длительный агранулоцитоз (100%) и лимфоцитопения (81,25%). Основной очаг инвазивного аспергиллеза – легкие (93,7%). Общая 12-недельная выживаемость составила 87,5%. У пациентов с факторами риска развития инвазивных микозов при выявлении изменений на КТ легких перед началом противоопухолевой терапии необходимо обследование для исключения инвазивного аспергиллеза. У больных с ОМЛ без нейтропении отрицательный результат теста на галактоманнан в сыворотке крови не исключает ИА. Наличие инвазивного аспергиллеза не является противопоказанием для проведения цитостатической терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Dinikina Yu.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2003-0982>

Belogurova M.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7471-7181>

Ignatyeva S.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0306-3694>

Bogomolova T.S. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2450-687X>

Klimko N.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6095-7531>

Литература

- Miller D.R., Miller L.P. Acute lymphoblastic leukemia in children: an update of clinical, biological, and therapeutic aspects. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990; 10 (2): 131–64.
- Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M.M., Gibson B., Dworzak M.N., Adachi S., de Bont E., et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 2012; 120 (16): 3187–205. DOI: 10.1182/blood-2012-03-362608
- Creutzig U., Reinhardt D., Diekamp S., Dworzak M., Stary J., Zimmermann M. AML patients with Down syndrome have a high cure rate with AML-BFM therapy with reduced dose intensity. *Leukemia* 2005; 19 (8): 1355–60.
- Tran T.H., Mitchell D., Dix D., Cellot S., Ethier M., Gilmeister B., et al. Infections in children with down syndrome and acute myeloid leukemia: a report from the Canadian infections in AML research

- group. *Infectious Agents and Cancer* 2013; 8: 2–7.
5. Portwine C., Mitchell D., Johnston D., Gillmeister B., Ethier M., Yanofsky R., et al. Infectious Events Prior to Chemotherapy Initiation in Children with Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One* 2013; 8 (4): e61899. DOI: 10.1371/journal.pone.0061899
 6. Sung L., Lange B.J., Gerbing R.B., Alonzo T.A., Feusner J. Microbiologically documented infections and infection-related mortality in children with acute myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 3532–9. DOI: 10.1182/blood-2007-05-091942
 7. Lehrnbecher T., Sung L. Anti-infective prophylaxis in pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 2014; 7: 819–30. DOI: 10.1586/17474086.2014.965140
 8. Nolt D., Lindemulder S., Meyrowitz J., Chang B.H., Malempati S., Thomas G., et al. Preventive antibiotics in pediatric patients with acute myeloid leukemia (AML). *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 1149–54. DOI: 10.1002/pbc.25463
 9. Bochennek K., Hassler A., Perner C., Gilfert J., Schöning S., Klingebiel T., et al. Infectious complications in children with acute myeloid leukemia: decreased mortality in multicenter trial AML-BFM 2004. *Blood Cancer J* 2016; 6: e382. DOI: 10.1038/bcj.2015.110.
 10. Ozyurek E., Vergin C., Büyükcavcı M., Kılınc Y., Timur V., Özbek N., et al. The outcomes of Turkish children with acute myeloid leukemia treated on AML-Berlin-Munster-Frankfurt (AML-BFM) protocol: Turkish AML-BFM Study Group. *Turk J Hematol* 2017; 34: 340–4. DOI: 10.4274/tjh.2017.0052
 11. Lehrnbecher T., Varwig D., Kaiser J., Reinhardt D., Klingebiel T., Creutzig U. Infectious complications in pediatric acute myeloid leukemia: Analysis of the prospective multi-institutional clinical trial AML-BFM 93. *Leukemia* 2004; 18: 72–7.
 12. Hassler A., Bochennek K., Gilfert J., Perner C., Schöning S., Creutzig U., et al. Infectious Complications in Children With Acute Myeloid Leukemia and Down Syndrome: Analysis of the Prospective Multicenter Trial AML-BFM 2004. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63 (6): 1070–4. DOI: 10.1002/pbc.25917
 13. Inaba H.I., Surprise H.C., Pounds S., Cao X., Howard S.C., Ringwald-Smith K., et al. Effect of body mass index on the outcome of children with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2012 Dec 1; 118 (23): 5989–96. DOI: 10.1002/cncr.27640
 14. Riley L.C., Hann I.M., Wheatley K., Stevens R.F. Treatment-related deaths during induction and first remission of acute myeloid leukaemia in children treated on the Tenth Medical Research Council acute myeloid leukaemia trial (MRC AML10). The MCR Childhood Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* 1999; 106: 436–44.
 15. Steinbach W.J. Invasive aspergillosis in pediatric patients. *Current Medical Research and Opinion* 2010; 26 (7): 1779–87. DOI: 10.1185/03007995.2010.487793
 16. Zaoutis T.E., Heydon K., Chu J.H., Walsh T.J., Steinbach W.J. Epidemiology, outcomes, and costs of invasive aspergillosis in immunocompromised children in the United States, 2000. *Pediatrics* 2006; 117: e711–6.
 17. Crassard N., Hadden H., Piens M.A., Pondarré C., Hadden R., Galambrun C., et al. Invasive aspergillosis in a paediatric haematology department: a 15-year review. *Mycoses* 2008 Mar; 51 (2): 109–16. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2007.01449.x
 18. Lin S.J., Schranz J., Teutsch S.M. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358–66. DOI: 10.1086/318483
 19. Apsemidou A., Petridis N., Vyzantidis T., Tragiannidis A. Invasive Aspergillosis in children: Update on Current Guidelines. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 2018; 10: 1–18. DOI: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2018.048>
 20. Zaoutis T.E., Heydon K., Chu J.H., Walsh T.J., Steinbach W.J. Epidemiology, outcomes, and costs of invasive aspergillosis in immunocompromised children in the United States, 2000. *Pediatrics* 2006; 117: 711–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2005-1161>
 21. Lehrnbecher T. Treatment of fever in neutropenia in pediatric oncology patients. *Current Opinion in Pediatrics* 2008; 1: 35–40. DOI: 10.1097/mop.0000000000000708
 22. Freifeld A.G., Bow E.J., Sepkowitz K.A., Boeckh M.J., Ito J.I., Mullen C.A., et al. Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011 Feb 15; 52 (4): 427–31. DOI: 10.1093/cid/ciq147
 23. Hubel K., Hegener K., Schnell R., Mansmann G., Oberhauser F., Staib P., et al. Suppressed neutrophil function as a risk factor for severe infection after cytotoxic chemotherapy in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 1999; 78: 73–7.
 24. Tanaka F., Goto H., Yokosuka T., Yanagimachi M., Kajiwara R., Naruto T., et al. Suppressed neutrophil function in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 2009; 90: 311–7. DOI: 10.1007/s12185-009-0412-4
 25. Плотникова С.В., Азнабаева Л.Ф., Сафуанова Г.Ш. Характеристики фагоцитирующих клеток у больных острым лейкозом с инфекционным синдромом. *Медицинская иммунология* 2013; 15 (4): 369–74.
 26. Camilli G., Eren E., Williams D.L., Aimaianianda V., Meunier E., Quintin J. Impaired phagocytosis directs human monocyte activation in response to fungal derived β -glucan particles. *Eur J Immunol* 2018 May; 48 (5): 757–70. DOI: 10.1002/eji.201747224
 27. Dagenais T., Keller N. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology reviews* 2009; 22 (3): 447–65.
 28. Bassetti M., Peghin M., Vena A. Challenges and Solutions of Invasive Spermilosis in Non-neutropenic Patients: A Review. *Infect Dis Ther* 2018; 7: 17–27.
 29. Groll A.H., Castagnola E., Cesaro S., Dalle J., Engelhard D., Hope W., et al. Fourth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *Lancet Oncol* 2014; 15: 320–40.
 30. Ullmann A.J., Aguado J.M., Arkan-Akdagli S., Denning D.W., Groll A.H., Lag-

- rou K., et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clinical Microbiology and Infection* 2018; 24(1): e1-38. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.01.002
31. Patterson T.F., Thompson G.R., Denning D.W., Fishman J.A., Hadley S., Herbrecht R., et al. Guidelines for the diagnosis and management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 15; 63 (4): 1–60.
 32. Burgos A., Zaoutis T., Dvorak C., Hoffman J., Knapp K., Nania J., et al. Pediatric invasive aspergillosis: A multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics* 2008; 121: e1286–94.
 33. Cornillet A., Camus C., Nimubona S., Gandemer V., Tattevin P., Belleguic C., et al. Comparison of Epidemiological, Clinical, and Biological Features of Invasive Aspergillosis in Neutropenic and Nonneutropenic Patients: A 6-Year Survey. *Clinical Infectious Diseases* 2016; 43: 577–84.
 34. Henzler C., Henzler T., Buchheidt D., Nance J.W., Weis C.A., Vogelmann R., et al. Diagnostic Performance of Contrast Enhanced Pulmonary Computed Tomography Angiography for the Detection of Angioinvasive Pulmonary Aspergillosis in Immunocompromised Patients. *Sci Rep* 2017; 7 (1): 4483. DOI: 10.1038/s41598-017-04470-6
 35. Bassetti M., Carnelutti A., Muser D., Righi E., Petrosillo N., Di Gregorio F., et al. 18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography and infectious diseases: current applications and future perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2017; 30 (2): 192–200. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000354
 36. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Фармтекб 2017; 272 с.
 37. Cordonnier C., Botterel F., Amor R.B., Pautas C., Maury S., Kuentz M., et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 81–6. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02122.x
 38. Zhou W., Li H., Zhang Y., Huang M., He Q., Li P., et al. Diagnostic Value of Galactomannan Antigen Test in Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Patients with Nonneutropenic Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2017; 55 (7): 2153–61. DOI: 10.1128/JCM.00345-17
 39. Viscoli C., Machetti M., Cappellano P., Bucci B., Bruzzi P., Teresa Van Lint M., Bacigalupo A. False-Positive Galactomannan Platelia Aspergillus Test Results for Patients Receiving Piperacillin-Tazobactam. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38: 913–6. DOI: <https://doi.org/10.1086/382224>
 40. Pana Z.D., Roilides E., Warris A., Groll A.H., Zaoutis T. Epidemiology of invasive fungal disease in children. *Journal of Pediatric Infectious Diseases Society* 2017; 6 (1): 3–11. DOI: 10.1093/jpids/pix046

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 06.05.2019

Принята к печати 10.06.2019

Синдром Клерикучио (пойкилодерма с нейтропенией)

Е.А. Деордиева, О.А. Швец, Е.С. Серова, А.В. Павлова, Е.В. Райкина, С.А. Плясунова,
А.И. Манджиева, А.В. Пшонкин, А.Ю. Щербина

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Синдром Клерикучио – редкое генетическое заболевание, относящееся к группе врожденных нейтропений, – впервые описано С. Clericuzio и соавт. в 1991 году у 14 пациентов из племени Навахо. Это заболевание характеризуется пойкилодермой и нейтропенией с рецидивирующими инфекциями и высоким риском развития миелодиспластического синдрома. Подходы к терапии не оптимизированы ввиду редкости данной патологии. В статье приведен обзор имеющихся на сегодняшний день данных об этом заболевании, обсуждается случай синдрома Клерикучио у мальчика 5 лет, с раннего возраста наблюдающегося в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева. Родители ребенка дали информированное согласие на использование персональных данных и фото ребенка в научных публикациях и исследованиях.

Ключевые слова: синдром Клерикучио, пойкилодермия, врожденная нейтропения, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, миелодиспластический синдром

Деордиева Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 96–103.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-96-103

Контактная информация:
Деордиева Екатерина Анатольевна,
канд. мед. наук, врач аллерголог-
иммунолог консультативного отделения.
НМИЦ детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: deor2005@yandex.ru

© 2019 by NMRC PHOI

Received 06.05.2019

Accepted 10.06.2019

Clericusio syndrome (poikiloderm with neutropenia)

E.A. Deordieva, O.A. Shvets, E.S. Serova, A.V. Pavlova, E.V. Raykina, S.A. Plyasunova, A.I. Mandzhieva,
A.V. Pshonkin, A.Yu. Shcherbina

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology,
Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Clericusio syndrome is a rare genetic disease belonging to the group of congenital neutropenias, first described by S. Clericuzio et al. in 1991, in 14 patients from the Navajo tribe. It is characterized by poikiloderma and neutropenia, with recurrent infections and a high risk of developing myelodysplastic syndrome. Approaches to therapy are not optimized due to the rarity of this pathology. The article provides an overview of the data on the disease available to date, and discusses the case of Clericusio syndrome in a 5-year-old boy, from an early age observed in Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Parents gave their permission for using personal data for clinical research and publications.

Key words: Clericusio syndrome, poikiloderma, congenital neutropenia, granulocyte colony-stimulating factor, myelodysplastic syndrome

Deordieva E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2019; 18 (3): 96–103.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-96-103

Correspondence:
Catherine A. Deordieva, MD, PhD,
immunology department Dmitriy
Rogachev National Medical Research
Center of Pediatric Hematology,
Oncology, Immunology Ministry of
Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow,
Samory Mashela st., 1
E-mail: deor2005@yandex.ru

Синдром Клерикучио, или пойкилодермия с нейтропенией (ПН), – редкое, генетически детерминированное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, относящееся к группе врожденных нейтропений, характеризующееся пойкилодермией, тяжелой нейтропенией, рецидивирующими синопульмональными инфекциями, пахионихией, ладонно-подошвенным гиперкератозом, черепно-лицевым дисморфизмом [1, 2]. Пойкилодермия представляет собой изменения кожи, включая сетчатую гиперпигментацию, атрофию, телеангиэктазии, мелкие участки депигментации, шелушение и нередко милиарные лихеноидные папулы.

В статье представлены обзор литературы и описание клинического случая этого редкого заболевания.

Впервые ПН описали С. Clericuzio и соавт. в 1991 году у 14 пациентов из племени индейцев Навахо [1], коренных американцев юго-запада Атабаска, поэтому эту патологию называли «пойкилодерма Навахо» [2]. Позднее данный синдром был описан у пациентов, не являющихся потомками Навахо, в связи с чем L.L. Wang и соавт. [3] предложили переименовать его, назвав «пойкилодермия с нейтропенией». В 2005 году Van Hove и соавт. описали турецкую семью с ПН и предложили новое название для данной патологии – «пойкилодерма с нейтропенией типа Клерикучио» [4]. Во всех семьях заболевание соответствовало аутосомно-рецессивному типу наследования.

В 2010 году в Италии впервые была описана мутация в гене *USB1 (C16orf57)*, приводящая к развитию синдрома Клерикучио [5]. В том же году эту

мутацию выявили еще в двух семьях – марокканской [6] и европейской [7]. На сегодняшний день описаны 23 мутации у 77 пациентов с ПН, которые ведут к образованию усеченного, нефункционального белка USB1; регулярно появляются описания новых мутаций [5, 8–21]. Идентифицированы несколько типов мутаций, перечисленных здесь в порядке убывания распространенности: нонсенс-мутации (с.232C>T; с.243G>A; с.258T>A; с.267T>A; с.415C>T; с.541C>T; с.673C>T), делеции (с.176_177delG; с.179delC; с.489_492del4; с.496delA; с.531delA; с.683_893 + 1del12), изменения сайтов сплайсинга, включая замены в канонических соединениях сплайсинга или в консенсусных последовательностях сплайс-сайтов (с.265 + 2T >G; с.266-1G>A; с.450-2A>G; с.502A>G; с.504-2A>C; с.693 + 1G>T) [22]. Большая часть пациентов имеет мутации в гомозиготном состоянии (89%), и лишь некоторые (11%) являются компаунд-гетерозиготами [5]. Данные изменения наглядно представлены в исследовании E.A. Colombo в 2014 году (рисунок 1) [22].

Рисунок 1

Распределение известных мутаций гена *USB1*, приводящих к ПН (2014)



USB1	символ	мутация	белок
экзон1	★	с.176_177delGG	p.(Gly59Alafs*2)
	★	с.179delC	p.Pro60Leufs*55
	●	с.232C>T	p.Arg78*
	●	с.243G>A	p.(Trp81*)
	●	с.258T>A	p.(Tyr86*)
интрон2	▲	с.265+2T>G	p.Tyr89Trpfs*3
	▲	с.266-1G>A	?
экзон3	●	с.267T>A	p.(Tyr89*)
	●	с.415C>T	p.(Gln139*)
интрон3	▲	с.450-2A>G	?
экзон4	★	с.489_492del4	p.(Asn163Lysfs*101)
	★	с.499delA (с.496delA)	p.(Thr167Profs*98)
	▲	с.502A>G	p.Phe151_Arg168del
интрон4	▲	с.504-2A>C	p.Thr169Ilefs*61
экзон5	★	с.531delA	p.His179Metfs*86
	●	с.541C>T	p.(Gln181*)
экзон6	●	с.673C>T	p.(Gln225*)
	▲	с.683_693+1del12	p.D204_Q231del
интрон6	▲	с.693+1G>T	p.D204_Q231del

Примечание: в таблице представлены конкретные мутации и их влияние на белок (нонсенс-мутации отмечены красным шестиугольником; делеции – желтой звездой; сплайсинговые мутации – синим треугольником) [22, с модификацией].

Ген *USB1(C16orf57)* локализован на 16q21 хромосоме, содержит 7 экзонов и кодирует белок из 265 аминокислот, называемый USB1 или hMPN1. Помимо канонического транскрипта экспрессируются еще несколько изоформ, в том числе альтернативный транскрипт USB1-004 (ENST00000423271), который содержит первые три экзона и альтернативный терминальный четвертый экзон и кодирует белок из 186 аминокислот, который экспрессируется в кератиноцитах, меланоцитах и фибробластах [5, 7, 8, 11].

Белок USB1 представляет собой 3'-5'РНК-экзонуклеазу из семейства 2H-фосфодиэстеразы, присутствующей уже в бактериях, археях и эукариотах [5]. Функция белка USB1 до конца не изучена. Известно, что РНК-экзонуклеазы участвуют в посттранскрипционном удалении последних нуклеотидов в молекуле малой ядрышковой РНК (мяРНК) пре-U6, приводя к образованию зрелой мяРНК U6 с содержанием 2'-, 3'-циклического фосфата и ее стабилизации [23–25]. В свою очередь мяРНК играет ключевую роль в сплайсинге РНК [23, 24]. Следовательно, мутация в гене *USB1* приводит к неправильной обработке 3'-конца U6, ускоренному распаду U6 и дефекту сплайсинга пре-мРНК. Это было доказано в исследовании на дрожжах: истощение *USB1* приводило к генерализованным дефектам сплайсинга пре-мРНК и более коротким теломерам. При исследовании клеточных линий от пациентов с ПН было подтверждено, что U6 – это субстрат *USB1*, однако при этом не обнаружено каких-либо явных дефектов в каноническом сплайсинге пре-мРНК, что позволяет предположить, что влияние неправильной обработки U6 варьирует среди разных организмов или, возможно, типов клеток [23–25].

Специфическая связь между мутациями гена *USB1* и признаками и симптомами ПН у человека также до конца неизвестна. Тем не менее наличие тканеспецифических изоформ фермента, возможно, поможет объяснить, почему это расстройство в основном влияет на кожу и иммунную систему. Как сказано выше, различные изоформы фермента *USB1* продуцируются в разных тканях, где они, вероятно, играют различные роли. В гематопозитических клетках фермент *USB1* важен в первую очередь для созревания нейтрофилов. В коже фермент *USB1* находится в пигмент-продуцирующих меланоцитах, а также в кератиноцитах и фибробластах [8, 24]. Так, например, ключевая роль *USB1* в нормальном кроветворении была предложена при моделировании пойкилодермии с нейтропенией у рыбок данио, так как эмбрионы с потерей функции *USB1* демонстрировали нарушенную фиксацию и дифференцировку предшественников нейтрофилов [26]. Действительно, морфолино-опосредованное воздействие на *USB1* у личинок рыбок данио вызывает aberrантный

сплайсинг пре-мРНК, кодирующих полипептиды, необходимые для дифференцировки и развития нейтрофилов. Инъекция сплайсированной мРНК устраняла дефекты развития нейтрофилов, указывая на то, что дефекты сплайсинга небольшого подмножества транскриптов ответственны за тканеспецифичные аномалии [26]. Кроме нейтропении, у некоторых исследуемых рыбок отмечали транзиторную тромбоцитопению и переменную анемию, это позволяет предположить, что у людей при ПН возможно более глобальное вовлечение костного мозга [8, 24]. Кроме того, исследования на рыбках данио показали, что дисфункция аппарата сплайсинга и нарушение тканеспецифического альтернативного сплайсинга влияют на экспрессию генов в определенных органах во время раннего эмбриогенеза [26]. Вероятно, это объясняет такие клинические признаки, как пойкилодерма и скелетные дефекты, включая остеопению и замедленное созревание скелета. У пациентов с ПН наблюдались также явные и массивные дефекты костей, образованных глоточными дугами, серьезное разрушение нескольких ветвистых дуг и связанных с ними хрящей, что проявляется в виде черепно-лицевых дефектов [26].

Клинические проявления синдрома Клеркузио разнообразны; одна из его особенностей – лицевой дисморфизм. При рождении черты лица ребенка кажутся нормальными, однако со временем обычно развиваются черепно-лицевые особенности: выступающий лоб, седловидный нос, гипоплазия средней части лица, умеренный прогнатизм, низко посаженные уши, гипертелоризм [8, 14, 20, 27]. Изменения со стороны кожи сразу после рождения также не выражены, но в среднем в возрасте – от 6 до 12 мес. – у ребенка появляется воспалительная экзематозная сыпь, манифестируя на конечностях с прогрессированием на туловище, лице, а иногда и на ушных раковинах. Впоследствии, ближе к 2 годам, воспалительная сыпь исчезает, появляется сухость кожи, и пойкилодерма приобретает вид областей гипер- и гипопигментации, атрофии и телеангиэктазии (может быть субклинической и проявляться только при биопсии кожи) [8, 20, 27]. Пойкилодерма сохраняется на протяжении всей жизни, может наблюдаться повышенная фоточувствительность [20]. Для данного синдрома характерен ладонно-подошвенный гиперкератоз [20, 28], пахионихии – утолщенные, гиперкератотические ногти [20, 28]. У части пациентов отмечают кальциноз кожи – небольшие узелки, которые могут быть локализованы на локтях, коленях и ушных раковинах или более диффузно [20, 28, 29]. Описана эпифора (слезотечение) из-за обструкции слезного протока узелками кальциноза; возможно также образование узелков на голосовых связках с гиперкератинизацией [14]. Брови и ресницы могут

быть редкими, волосы – сухими и тонкими [20]. Для большинства пациентов характерны течение хронического гингивита и кариес, приводящий к ранней потере зубов [20].

Почти 90% пациентов с ПН имеют рецидивирующие легочные инфекции, сопровождающиеся развитием бронхоэктазов, абсцессов и гранулем легкого. Хронический рецидивирующий средний отит и синусит часто встречаются в раннем возрасте, описаны случаи снижения слуха у таких пациентов [20]. У детей старше 5–10 лет частота острых синопульмональных инфекций сокращается, но у большинства пациентов по-прежнему наблюдаются бронхоэктазии, хронический непродуктивный кашель и частые заболевания дыхательных путей [15–17, 20].

Среди гематологических изменений следует выделить нейтропению, которую, как правило, выявляют в раннем детстве. Снижение нейтрофилов варьирует от агранулоцитоза до умеренно выраженного [13, 15, 16, 18, 20, 22, 26]. Описана преходящая тромбоцитопения и переменная анемия (около 50% случаев), что, как было отмечено, предполагает глобальное вовлечение костного мозга (КМ) при ПН [4, 10, 11, 13]. При исследовании КМ наблюдается гипоцеллюлярность; возможно сужение нейтрофильного ростка с преобладанием ранних миелоидных предшественников [4, 8]. У пациентов с ПН повышен риск развития миелодиспластического синдрома и злокачественных образований кожи (карциномы) [15, 22, 26]. При исследовании клеточного и гуморального звеньев иммунитета выраженных отклонений не отмечено [13, 15, 16, 18, 20, 22, 26]. Практически все пациенты имеют повышенную сывороточную лактатдегидрогеназу (ЛДГ) – этиология этого феномена неизвестна. У некоторых пациентов имеется небольшое повышение аланиламинотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), ферритина и креатинфосфокиназы (КФ) [13, 15, 16, 18, 20, 22, 26]. Гипогонадотропный гипогонадизм, вызывающий задержку полового созревания, – распространенное явление у пациентов с ПН [20]. К другим проявлениям относится задержка роста, резистентная к гормонам роста [14].

Во многих случаях диагноз ПН устанавливают на основании совокупности клинических и лабораторных данных, однако однозначное подтверждение диагноза ПН основано на молекулярно-генетическом тестировании, демонстрирующем биаллельные патогенные варианты гена *USB1* [8, 25, 28].

Стандартные терапевтические алгоритмы лечения пациентов с синдромом Клеркузио отсутствуют, лечение индивидуально, направлено на коррекцию конкретных симптомов и может потребовать скоординированных усилий группы специалистов. Использование гранулоцитарно-колониестимулирующего

фактора (Г-КСФ) у пациентов с врожденной нейтропенией, в частности с ПН, увеличивает абсолютное количество нейтрофилов (АКН) [30], однако на сегодняшний день нет доказательств его клинического эффекта (например, снижение частоты инфекций) [3, 4, 8, 31]. Учитывая данный факт, использование Г-КСФ целесообразно только у пациентов с тяжелыми инфекционными эпизодами на фоне агранулоцитоза [3, 4, 8].

Основной проблемой для врача является дифференциальная диагностика: клинические проявления у пациентов с ПН, синдромом Ротмунда–Томсона (РТС) и врожденным дискератозом (ДК) схожи – это пойкилодермия, аномалия ногтей, ладонно-подошвенный гиперкератоз, дефицит роста, повышенный риск развития малигнизаций [2, 3, 10, 16, 18, 32]. Однако при ПН, в отличие от РТС, пациенты имеют значительную нейтропению, приводящую к рецидивам синопульмональных инфекций. Синдром Ротмунда–Томсона вызывает мутация в гене *RECQL4*, который, как полагают, взаимосвязан с *USB1* через белки SMAD4, что объясняет частичное клиническое совпадение ПН и РТС. В литературе встречаются описания случаев постановки диагноза ПН только после выявления дефектов гена *USB1* у пациентов с клинической картиной ДК и РТС [5, 10, 18].

Приводим описание клинического случая: мальчик, 5 лет, наблюдается в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева с 2014 года по настоящее время. Родители дали согласие на использование персональных данных в клинических исследованиях и публикациях.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Из анамнеза пациента, мальчика, 2013 г.р., известно, что это первый ребенок от неблизкородственного брака (сестра, 3 года, здорова). У мальчика с рождения диагностировали двустороннюю тугоухость; в 4 мес. отмечены эритематозные высыпания; с 10 мес. отчетливо проявились изменения кожи по типу пойкилодермии, а также деформация ногтевых пластин. После 2 лет присоединился распространенный рецидивирующий контагиозный моллюск. Среди других инфекционных заболеваний можно отметить у пациента рецидивирующие панариции, бронхиты, пневмонии, афтозные стоматиты, реактивный артрит, катаральные и гнойные отиты. С раннего возраста периодически наблюдался также лимфопролиферативный синдром (ЛПС) в виде лимфоаденопатии с тенденцией к нарастанию, потребовавшей в итоге проведения диагностической биопсии. Гистологически обнаружены признаки реактивной фолликулярной и паракортикальной гиперплазии. С 2019 года присоединилась умеренная гепатоспленомегалия. Среди сопутствующих патологий у ребенка имеются:

аутоиммунный тиреоидит и субклинический гипотиреоз, вторичный гиперпаратиреоз, нефрокальциноз двусторонний, ангиопатия сетчатки, врожденный порок сердца ВПС (ДМЖП, ООС).

При осмотре наблюдаются множественные стигмы дизэмбриогенеза: эпикант, антимонголоидный разрез глаз, выпуклый лоб, диспластичные низко расположенные ушные раковины, уплощенная переносица, вздернутые ноздри, высокое небо, удлиненный фильтр, треугольный рот, микрогнатия, гипоплазия средней части лица, «двузубец» на стопах (рисунок 2). Среди других особенностей фенотипа ребенка: 0-образная деформация голеней, низко расположенное пупочное кольцо, гиперэластичность кожных покровов, переразгибание в суставах. Изменения кожи у ребенка представлены пойкилодермией, подошвенным кератозом, кальцинозом кожи, наблюдается также деформация ногтевых пластин (рисунок 3).

Основные лабораторные показатели за время наблюдения пациента в условиях НМИЦ ДГОИ пред-

Рисунок 2

Фенотипические особенности лицевого скелета у ребенка с синдромом Клерикуюзио (фотографии ребенка предоставлены с согласия родителей)



Рисунок 3

Изменение кожи и придатков у пациента с ПН: А, Б – пойкилодермия; В – подошвенный кератоз; Г – кальциноз кожи; Д – пахионихия (деформация ногтевых пластин). Фотографии ребенка предоставлены с согласия родителей



Таблица 1

Лабораторная характеристика пациента с синдромом Клеркузио, 2014–2019 гг.

Показатель	04.04.2014	09.06.2015	12.07.2016	31.10.2018	20.05.2019 терапия Г-КСФ	Норма
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,75	3,28	3,92	7,7	12,49	6,05–9,85
АКН, $\times 10^9/\text{л}$	0,07	0,65	0,47	0,27	5,45	2,0–7,0 \times
АКМ, $\times 10^9/\text{л}$	0,81	0,36	0,313	1,155	2,123	0,2–1,8 \times
АКЭ, $\times 10^9/\text{л}$	0	0,032	0,039	0,07	0	0,02–0,5 \times
АКЛ, $\times 10^9/\text{л}$	5,872	2,82	3,96	4,31	2,498	1,0–3,0 \times
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	352	258	97	121	30	150–400 \times
Гемоглобин, г/л	118	119	101	99	58	115–138
T-cells (CD3+), $\times 10^9/\text{л}$	3,464	3,46	1,706	2,2	2,194	1,46–5,44
CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	2,12	1,208	0,977	1,2	1,334	1,02–3,6
CD8 +, $\times 10^9/\text{л}$	1,24	0,599	0,663	0,95	0,676	0,57–2,23
B-cells, $\times 10^9/\text{л}$	1,91	1,401	1,1908	1,16	1,393	0,5–1,5
NK cells, $\times 10^9/\text{л}$	0,39	0,145	0,17	0,25	0,591	0,246–0,896
IgA, г/л	0,228	0,72	0,67	0,96	0,789	0,80–2,80
IgM, г/л	0,499	0,73	1,21	1,38	1,77	0,3–1,8
IgG, г/л	4,94	5,52	4,55	5,52	6,95	4,6–14,6
АСТ, ед./л	63,3	58,9	58	62	40	0–96
АЛТ, ед./л	28,1	40,5	26	52	26	0–44
ЛДГ, ед./л	583	1042	794	662	636	108–430
Ферритин, ед./л	–	109	113	79,7	1702	10–60

ставлены в *таблице 1*, в том числе прогрессирующая инициальная нейтропения, тромбоцитопения и анемия, нарастание ферритина, повышенное содержание ЛДГ, при этом сывороточные иммуноглобулины и основные субклассы лимфоцитов крови находятся в пределах возрастной нормы.

При проведении костномозговой пункции (КМП) в возрасте 18 мес. отмечено обеднение клеточного состава с повышенным содержанием бластных клеток до 11%, сужение нейтрофильного ростка за счет снижения содержания молодых форм, а также сужение эритроцитарного ростка и эритропоэз с чертами мегалобластности. При повторном исследовании КМП в возрасте 36 мес. зафиксировано снижение бластных клеток до 0,5%; отмечен сохранный нейтрофильный росток с омоложением и чертами диспоэза; сохраняется эритропоэз с чертами мегалобластности. При проведении последующих КМП в динамике (1 раз в год) показатели оставались без существенных изменений. Нейтрофильный росток представлен в *таблице 2*.

Таблица 2

Костномозговая пункция пациента с синдромом Клерукизио в возрасте 18 мес., 36 мес., 5 лет (нейтрофильный росток)

Показатель	Норма, %	18 мес.	36 мес.	5 лет
Недиф. бластные клетки	0,6–3,5	11	0,5	3,2
Миелобласты	0,7–2,8	–	–	–
Промиелоциты	4,2–7,5	3	2,5	5,6
Миелоциты	7–11,5	7	19,5	15,6
Метамиелоциты	4,6–7,7	5	6,5	5,2
П/я нейтрофилы	13–19,8	12	8,5	11,2
С/я нейтрофилы	6,1–9,9	10,5	24,5	20,4
Сумма нейтрофилов	35–56	37,5	25	58,0

В 2019 году пациенту выполнена трепанобиопсия в связи с нарастающей трехростковой цитопенией: в пределах исследованного материала выявлены морфологические признаки гиперплазии гранулоцитарного ростка гемопоэза, вероятно, вследствие предшествующего длительного использования Г-КСФ, и признаки гемофагоцитоза.

В рамках имеющейся клинической картины ребенку провели дополнительные обследования:

- цитогенетическое исследование костного мозга – патологии не выявлено;

- прямая и непрямая пробы Кумбса – отрицательные;
- TREC/KREC – в норме.

Учитывая наличие у пациента раннего дебюта нейтропии, мы исключили ряд первичных иммунодефицитных состояний и гематологических патологий с характерной клинической картиной. Путем секвенирования по Сэнгеру были исключены мутации в следующих генах: *HAX1*, *ELANE*, *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL*, *WAS*, *FOXP3*, *TINF2* (6 экзон), *TERC* (1 экзон), *DKC1*, *SBDS*; исключена делеция 22q11.2.

На основании нарастающих проявлений пойкилодермы в сочетании с лабораторными изменениями в итоге был заподозрен синдром Клерукизио, который подтвердился при молекулярно-генетическом исследовании (прямое секвенирование по Сэнгеру): выявлена мутация в гене *USB1* 2 Ex. с.395_406delACCACTGGATCCTCC, p.His132_Leu135del, в гомозиготном состоянии.

Для уточнения происхождения выявленных изменений проведено генетическое обследование родителей: у отца ребенка в гене *USB1* выявлена делеция с.395_406delACTGGATCCTCC p.His132_Leu135del, в гетерозиготном состоянии; у матери в гене *USB1* мутация не выявлена. Эти данные послужили основанием для проведения хромосомного микроматричного исследования крови пациента, по результатам которого выявлена однородительская дисомия хромосомы 16 (на которой находится ген *USB1*) – феномен, при котором пара хромосом унаследована от одного родителя и ни одной соответствующей хромосомы – от другого [33].

С декабря 2015 года в качестве патогенетического лечения нейтропии ребенок получает Г-КСФ в дозе 5–10 мкг/кг/сут, 1 раз в 3 дня, однако на фоне данной терапии сохранялись тяжелые синопульмональные заболевания, требовавшие госпитализации и назначения антибактериальной терапии препаратами широкого спектра действия. В 2018 году, учитывая наличие тяжелых инфекционных заболеваний, инициирована терапия внутривенным иммуноглобулином (ВВИГ). Неоднократно ребенок получал трансфузии эритроцитарной массы и тромбоконцентрата в связи с нарастанием двух- или трехростковой цитопении. В 2019 году в связи с наличием трехростковой цитопении, сохранностью ростков кроветворения в костном мозге, отсутствием данных за гемобластоз, наличием ЛПС в качестве иммуносупрессии ребенку проведена пульс-терапия солу-медролом в дозе 10 мг/кг в течение 3 суток, а также инициирована базовая иммуносупрессия препаратом сиролimus в дозе 1,25 мг/сут, ежедневно, под контролем концентрации препарата в крови, принимая во внимание положительный ответ со стороны ЛПС и цитопении у пациентов с АЛПС [34]. На этом фоне отмечена

положительная динамика: нарастание содержания гемоглобина, тромбоцитов, отсутствие потребности в заместительных гемотрансфузиях. Таким образом, несмотря на отсутствие серологического подтверждения, нельзя исключить иммунный генез цитопении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синдром Клерикучио – редкое заболевание из группы первичных иммунодефицитных состояний, а именно врожденных нейтропений. В силу редкости этого заболевания, схожести его клинических проявлений с другими гематологическими патологиями возникают сложности в правильной постановке диагноза. Данное заболевание стоит рассматривать при проведении диагностического поиска у пациентов с цитопениями в сочетании с поражением кожи и ее производных. Однозначные терапевтические подходы при ведении пациентов с ПН не разработаны, не определены также прогностические маркеры заболевания. Интересная особенность представленного

случая состоит в сочетании типичных клинических признаков ПН с дополнительными синдромальными чертами – врожденным пороком сердца и тугухостью, ранее не описанных у пациентов с данным заболеванием. Возможно, это связано с наличием у пациента дополнительной цитогенетической аномалии – однородительской дисомии, которая нередко сопровождается различными пороками развития.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Deordieva E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8208-2075>
Shvets O.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5347-7150>
Serova E.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5333-6718>
Pavlova A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3974-5662>
Raykina E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7634-2053>
Mandzhieva A.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4039-430X>
Pshonkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>
Shcherbina A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3113-4939>

Литература

- Clericuzio C., Hoyme H.E., Aase J.M. Immune deficient poikiloderma: a new genodermatosis. *Am J Hum Genet* 1991; 49: A661.
- Erickson R.P. Southwestern Athabaskan (Navajo and Apache) genetic diseases. *Genet Med* 1999; 1: 151–7.
- Wang L.L., Gannavarapu A., Clericuzio C.L., Erickson R.P., Irvine A.D., Plon S.E. Absence of RECQL4 mutations in poikiloderma with neutropenia in Navajo and non-Navajo patients. *Am J Med Genet Part A* 2003; 118A: 299–301.
- Van Hove J.L., Jaeken J., Proesmans M., Boeck K.D., Minner K., Matthijs G., et al. Clericuzio type poikiloderma with neutropenia is distinct from Rothmund–Thomson syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 132A: 152–8.
- Volpi L., Roversi G., Colombo E.A., Leijsten N., Concolino D., Calabria A., et al. Targeted next-generation sequencing appoints C16orf57 as Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia gene. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 72–6.
- Mostefai R., Morice-Picard F., Boralevi F., Sautarel M., Lacombe D., Stasia M.J., et al. Poikiloderma with neutropenia, Clericuzio type, in a family from Morocco. *Am J Med Genet A* 2010; 146A (21): 2762–9.
- Arnold A.W., Itin P.H., Pigors M., Kohlhase J., Bruckner-Tuderman L., Has C. Poikiloderma with neutropenia: a novel C16orf57 mutation and clinical diagnostic criteria. *Br J Dermatol* 2010; 163: 866–9.
- Colombo E.A., Bazan J.F., Negri G., Gervasini C., Elcioglu N.H., Yucelten D., et al. Novel C16orf57 mutations in patients with poikiloderma with neutropenia: bioinformatic analysis of the protein and predicted effects of all reported mutations. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 7.
- Tanaka A., Morice-Picard F., Lacombe D., Nagy N., Hide M., Taieb A. McGrath J. Identification of a homozygous deletion mutation in C16orf57 in a family with Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia. *Am J Med Genet A* 2010; 152A: 1347–8.
- Walne A.J., Vulliamy T., Beswick R., Kirwan M., Dokal I. Mutations in C16orf57 and normal-length telomeres unify a subset of patients with dyskeratosis congenita, poikiloderma with neutropenia, and Rothmund–Thomson syndrome. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 4453–61.
- Clericuzio C., Harutyunyan K., Jin W., Erickson R.P., Irvine A.D., McLean W.H., et al. Identification of a novel C16orf57 mutation in Athabaskan patients with poikiloderma with neutropenia. *Am J Med Genet A*. 2011; 155A: 337–42. DOI: 10.1002/ajmg.a.33807
- Piard J., Holder-Espinasse M., Aral B., Gigot N., Rio M., Tardieu M., et al. Systematic search for neutropenia should be part of the first screening in patients with poikiloderma. *Eur J Med Genet* 2012; 55: 8–11.
- Farruggia S., Indaco C., Dufour T., Lanza C., Mosa A., Macaluso M., et al. LanciottiPoikiloderma with neutropenia: a case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014; 36 (4): 297–300.
- Koparir A., Gezdirici A., Koparir E., Ulucan H., Yilmaz M., Erdemir A., et al. Poikiloderma with neutropenia: genotype-ethnic origin correlation, expanding phenotype and literature review. *Am J Med Genet A* 2014; 164A: 2535–40.
- Patiroglu T., Akar H.H. Clericuzio-type

- Poikiloderma with neutropenia syndrome in a Turkish family: a three report of siblings with mutation in the C16orf57 gene. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015; 14: 331–7.
16. Kilic S.S., Cekic S. Juvenile idiopathic inflammatory myopathy in a patient with dyskeratosis congenita due to C16orf57 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2016; 38 (2): e75–7.
 17. Suter A.A., Itin P., Heinimann K., Ahmed M., Ashraf T., Fryssira H., et al. Rothmund-Thomson Syndrome: novel pathogenic mutations and frequencies of variants in the RECQL4 and USB1 (C16orf57) gene. *Mol Genet Genomic Med* 2016; 4: 359–66.
 18. Walne A.J., Collopy L., Cardoso S., Ellison A., Plagnol V., Albayrak C., et al. Marked overlap of four genetic syndromes with dyskeratosis congenita confounds clinical diagnosis. *Haematologica* 2016; 101: 1180–9.
 19. Aglaquel A., Abdelghaffar H., Aital F., Habti N., Hesse S., Kohistani N., et al. Poikiloderma with neutropenia in Morocco: a report of 4 cases. *J Clin Immunol* 2017; 37: 357–62.
 20. Wang L., Clericuzio C., Larizza L. Poikiloderma with Neutropenia Synonym: Clericuzio-Type Poikiloderma with Neutropenia. *GeneReviews* [Internet] 2017.
 21. Colombo E.A., Elcioglu N.H., Graziano C., Farinelli P., Di Fede E., Neri I., et al. Insights into Mutation Effect in Three Poikiloderma with Neutropenia Patients by Transcript Analysis and Disease Evolution of Reported Patients with the Same Pathogenic Variants. *J Clin Immunol* 2018; 38 (4): 494–502.
 22. Colombo E.A. USB1 (U6 snRNA biogenesis 1) Atlas Genetics Oncolo. 2014. DOI: 10.4267/2042/54037
 23. Mroczek S., Krwawicz J., Kutner J., Lazniewski M., Kuciński I., Ginalski K., et al. C16orf57, a gene mutated in poikiloderma with neutropenia, encodes a putative phosphodiesterase responsible for the U6 snRNA 3' end modification. *Genes Dev* 2012; 26: 1911–25. DOI: 10.1101/gad.193169.112
 24. Shchepachev V., Wischniewski H., Missiaglia E., Sonesson C., Azzalin C.M. Mpn1, mutated in poikiloderma with neutropenia protein 1, is a conserved 3'-to-5' RNA exonuclease processing U6 small nuclear RNA. *Cell Rep* 2012; 2: 855–65.
 25. Hilcenko C., Simpson P.J., Finch A.J., Bowler F.R., Churcher M.J., Jin L., et al. Aberrant 3' oligoadenylation of spliceosomal U6 small nuclear RNA in poikiloderma with neutropenia. *Blood* 2013; 121: 1028–38.
 26. Colombo E.A., Carra S., Fontana L., Bresciani E., Cotelli F., Larizza L. A zebrafish model of poikiloderma with neutropenia recapitulates the human syndrome hallmarks and traces back neutropenia to the myeloid progenitor. *Scientific Reports* 2015; 5: 15814.
 27. Concolino D., Roversi G., Muzzi G.L., Sestito S., Colombo E.A., Volpi L., et al. Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia syndrome in three sibs with mutations in the C16orf57 gene: delineation of the phenotype. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A: 2588–94.
 28. Concolino D., Sestito S., Falvo F., Romano G., Cervolo M., Anastasio M., et al. Assessment of intrafamilial clinical variability of poikiloderma with neutropenia by a 10-year follow-up of three affected siblings. *Eur J of Med Genet* Jan 2019; 73–6.
 29. Chantorn R., Shwayder T. Poikiloderma with neutropenia: report of three cases including one with calcinosis cutis. *Pediatr Dermatol* 2012; 29: 463–72.
 30. Деордиева Е.А., Щербина А.Ю. Нейтропения в практике детского гематолога/онколога. *Онкогематология* 2015; 1: 46–52.
 31. Rodgers W., Ancliff P., Ponting C.P., Sanchez-Pulido L., Burns S., Hayman M., et al. Squamous cell carcinoma in a child with Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia. *Br J Dermatol* 2013; 168: 665–7.
 32. Larizza L., Roversi G., Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 2.
 33. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *Journal of Medical Genetics* 2001; 38: 497–507.
 34. Швец О.А., Дерипапа Е.В., Абрамова И.Н., Викторова Е.А., Родина Ю.А., Деордиева Е.А. и др. Эффективность сиролимуса в терапии аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 7 (1): 7–25.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 10.04.2019

Принята к печати 10.06.2019

Феномен реверсной мутации у пациента с синдромом Вискотта–Олдрича

З.А. Нестеренко, Н.Б. Кузьменко, В.И. Бурлаков, Е.А. Викторова, В.А. Ведмедская, Д.Е. Першин, А.М. Киева, И.В. Мерсиянова, Т.А. Варламова, Е.В. Райкина, Е.В. Дерипапа

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) – это гетерогенные, генетически обусловленные заболевания иммунной системы. Один из генетических феноменов, влияющих на фенотипическое разнообразие ПИДС, – реверсный соматический мозаицизм (РМ), характерный для различных групп ПИДС. Чаще всего РМ встречается у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича. Несмотря на то что РМ не всегда ведет к более легкому течению болезни, наличие этого феномена может влиять на скорость постановки диагноза, что сказывается на своевременности назначения адекватного лечения. В данной статье представлен случай пациента с синдромом Вискотта–Олдрича и реверсной мутацией в гене WAS. Родители пациентов дали согласие на использование информации о ребенке в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: синдром Вискотта–Олдрича, ген WAS, реверсная мутация, генотип, фенотип

Нестеренко З.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 104–111.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-104-111

Контактная информация:

Кузьменко Наталья Борисовна, зав. отделом эпидемиологии и мониторинга иммунодефицитов, врач аллерголог-иммунолог КДО НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: plunge@list.ru

© 2019 by NMRC PHOI

Received 10.04.2019

Accepted 10.06.2019

The phenomenon of reverse mutation in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome

Z.A. Nesterenko, N.B. Kuzmenko, V.I. Burlakov, E.A. Victorova, V.A. Vedmedskaya, D.E. Pershin, A.M. Kiev, I.V. Mersyanova, T.V. Varlamova, E.V. Raykina, E.V. Deripapa

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Primary immunodeficiencies (PIDS) are genetically caused heterogeneous diseases of the immune system. One of the genetic phenomenon affecting the phenotypic diversity of PIDS is a reverse somatic mosaicism (RM) observed in different groups of PIDS. The majority of RM cases are described in patients with Wiskott–Aldrich syndrome (WAS). Despite the fact that PM does not always lead to a mild form of the disease, the presence of this phenomenon can cause the delay of diagnosis and start of the appropriate treatment. This article presents the case of a patient with Wiskott–Aldrich syndrome with a reverse mutation in the WAS gene. Parents gave their consent to use information about the child in the article.

Key words: Wiskott–Aldrich syndrome, WAS gene, reverse mutation, genotype, phenotype

Nesterenko Z.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2019; 18 (3): 104–111.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-104-111

Correspondence:
Natalia B. Kuzmenko, MD, PhD, the head of the department of epidemiology and monitoring of immunodeficiencies, Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: plunge@list.ru

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) представляют фенотипически разнородную группу генетически обусловленных заболеваний, связанных с дефектами тех или иных компонентов иммунной системы. Фенотипическая гетерогенность ПИДС вызвана не только большим разнообразием поврежденных генов иммунной системы (описано более 300 генов) [1], но и различными генетическими феноменами, характерными для этой группы заболеваний. Например, стертая или нетипичная клиническая картина может наблюдаться в случае гипоморфных мутаций, которые приводят к частичному нарушению функции кодируемого белка, но не нарушают ее полностью [2, 3].

Другое явление, потенциально меняющее фенотип болезни, – реверсный соматический мозаицизм (РМ), описанный при различных наследственных заболеваниях, в том числе ПИДС. В результате реверсных мутаций восстанавливается дикий тип гена, поврежденного патогенной мутацией, меняется генотип клеточной популяции, и экспрессия белка этой популяцией клеток соответствует нормальным значениям. В некоторых случаях РМ становится причиной неспецифических клинических проявлений или легкого течения заболевания и может служить примером своего рода «естественной генной терапии» [4].

Под термином «мозаицизм» понимают наличие как минимум двух генетически различных популяций

соматических или герминальных клеток в организме. На протяжении жизни в соматических клетках возникает огромное количество генетических изменений, приводящих к серьезным фенотипическим проявлениям вплоть до летального исхода. Одним из механизмов, нивелирующих эти процессы, является РМ [5]. Реверсный мозаицизм возникает в результате обратных мутаций – реверсий (*back mutation*), которые непосредственно приводят к восстановлению дикого типа гена, поврежденного другой мутацией, либо в результате супрессорных мутаций (*second-site mutation*), полностью или частично подавляющих прямую мутацию [6].

Генетические изменения при реверсиях могут варьировать от однонуклеотидных замен до крупных геномных делеций. Факторы и механизмы развития такого разнообразия до конца не ясны [7]. Предполагается, что РМ возникает в результате внутригенной рекомбинации, конверсии генов, ошибок ДНК-полимеразы, приводящих к «проскальзыванию» цепей ДНК в процессе репликации, а также других дефектов репарации ДНК [8]. В большинстве случаев реверсии были обнаружены в клетках крови (как правило, лимфоидного ряда), кожи, а также нейронах, что, возможно, сопряжено со скоростью пролиферации данных клеточных популяций [4].

С конца 1980-х годов, когда реверсный мозаицизм был описан впервые, об этом явлении сообщали при различных наследственных заболеваниях: при анемии Фанкони, буллезном эпидермолизе, тирозинемии I типа, мышечной дистрофии Дюшенна, болезни Шарко–Мари–Туа и др. [9–11].

Несмотря на технические сложности в выявлении данного феномена, в последние десятилетия растет количество сообщений о реверсном мозаицизме при первичных иммунодефицитах. В 1994 году впервые был опубликован клинический случай РМ при недостаточности аденозиндезаминазы, относящейся к группе тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (ТКИН) [12]. За два последних десятилетия появилось большое количество сообщений о выявленных реверсиях при синдроме Вискотта–Олдрича, X-сцепленной ТКИН, дефекте адгезии лейкоцитов (LAD1), синдроме NEMO и др. [6, 7, 12–50].

По сравнению с другими ПИДС реверсный мозаицизм наиболее часто встречается при синдроме Вискотта–Олдрича (СВО); распространенность РМ составляет около 11% [6]. СВО – это моногенное заболевание с тромбоцитопенией, экземой и иммунодефицитом разной степени тяжести [51, 52], которое возникает в результате мутаций в гене *WAS* (*Wiskott–Aldrich Syndrome*), расположенном на Xp11.23 и кодирующем синтез белка WASP. На данный момент описано более 400 различных мутаций, которые случаются на протяжении всей последова-

тельности гена, однако зарегистрировано около девяти горячих точек (*hotspot region*), которые составляют примерно одну треть общего числа описанных мутаций. В зависимости от локализации и вида мутации степень выраженности клинических проявлений у пациентов может варьировать и частично коррелирует с экспрессией белка WASP [53].

Причины, обуславливающие высокую распространенность реверсий при СВО, неизвестны. Согласно одной из гипотез, высокая частота мутаций связана с повышенной склонностью последовательности гена *WAS* к ошибкам ДНК-полимеразы. До того как *T. Wada* и *соавт.* впервые опубликовали сообщение о случае, когда к реверсии приводила делеция 6 нуклеотидов, считалось, что РМ – следствие точечных мутаций. Согласно предположению, выдвинутому *T. Wada* и *соавт.*, в результате большого количества повторов фрагмента нуклеотидов GC происходит их соединение с помощью комплементарных связей и образование «шпилек», которые нарушают считывание фрагмента ДНК ДНК-полимеразой, то есть приводят к «соскальзыванию» ДНК-полимеразы во время репликации, либо считыванию последовательности нуклеотидов, образующих «шпильку» [16].

Существует другая гипотеза, согласно которой нестабильность гена *WAS* в Т-хелперах (Th1) обусловлена образованием R-петель (*R-loops*). Транскрипция РНК представляет собой многоэтапный процесс, который включает в себя синтез пре-мРНК (интрон-содержащих цепей). В связи с тем, что связь ДНК/РНК более стабильна по сравнению с ДНК/ДНК, происходит гибридизация РНК с комплементарной цепью двухцепочечной ДНК, при этом вытесняется исходная цепь ДНК в виде петли, расположенной в области гибридизации, – R-петли. Этот процесс происходит при участии ферментов РНКазы, РНК/ДНК-геликазы, комплексов TNO и SRSF1, а также топоизомеразы, которые, в свою очередь, играют решающую роль в стабилизации генома, предотвращая чрезмерное образование R-петель. Непосредственно к нестабильности генома приводит образование одно- или двухцепочечных разрывов ДНК (SSB или DSB соответственно) в результате компенсаторного расщепления R-петель. Они встречаются примерно в 5% генома человека и могут участвовать в процессах инициации и элонгации транскрипции генов, переключении классов иммуноглобулинов, репликации и репарации ДНК. В данном исследовании обнаружено, что нарушение работы топоизомеразы сопряжено с дефицитом белка WASP и, как следствие, избыточным образованием R-петель и ростом SSB или DSB. Таким образом, высокая частота реверсии в популяции СВО, возможно, связана с участием белка WASP в стабильности генома [54]. Важен тот факт, что клетки с реверсными мутациями

при СВО обладают селективным преимуществом по сравнению с мутированными популяциями [55].

В масштабном мультицентровом исследовании распространенности спонтанных генетических реверсий при СВО, подготовленном к XII встрече Европейского общества по первичным иммунодефицитам (*European Society for Immunodeficiencies – ESID*), приняло участие 40 исследовательских групп из разных стран мира. В общей сложности из 272 пациентов с подтвержденным диагнозом СВО реверсный мозаицизм был выявлен у 30 (11%). В исследовании участвовали пациенты в возрасте от 3 мес. до 43 лет. Экспрессия реверсного гена *WASP* была зарегистрирована в основном в Т-клетках (5–80%), реже – в В- и NK-лимфоцитах; в миелоидных клетках до настоящего момента случаев реверсии не обнаружено. Как правило, в реверсной популяции клеток чаще встречался один генотип, однако в нескольких случаях наблюдались множественные реверсии [6, 24–27].

По результатам оценки тяжести СВО по стандартной 5-балльной шкале, средний балл до реверсии – 4, после реверсии – 4,1. Следовательно, можно сделать вывод, что реверсные мутации не влияют на фенотип заболевания и не снижают его тяжесть. Однако, учитывая огромное разнообразие мутаций гена *WAS* и корреляцию генотип-фенотип, а также разнородность выборки, различную частоту реверсного пула клеток и отсутствие сравнения со здоровым контролем, искать корреляцию между тяжестью заболевания и возникновением реверсии не представляется возможным.

Так, в крупном исследовании *Y. Jip* и соавт. из 262 человек с СВО у двух неродственных пациентов одного возраста была обнаружена одинаковая мутация – инсерция нуклеотида А в положении 471 в 4 экзоне, приводящая к сдвигу рамки считывания и преждевременному образованию стоп-кодона. Однако у

одного из пациентов была найдена реверсия данной мутации, и его фенотип соответствовал легкому течению СВО (2 балла), а у другого, напротив, наблюдалось тяжелое течение заболевания (4 балла), что в данном случае свидетельствует о положительном влиянии РМ [56]. Тем не менее пока нельзя с уверенностью сказать, что при СВО обнаружение лимфоцитов с реверсными мутациями связано с более легкой клинической формой заболевания [6, 55].

Приводим описание клинического наблюдения пациента с синдромом Вискотта–Олдрича и реверсной мутацией в гене *WAS*. Родители пациентов дали согласие на использование персональных данных в клинических исследованиях и публикациях.

Описание клинического случая

В отделение иммунологии НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева поступил ребенок Т., 2017 г.р., с проявлениями кожного геморрагического синдрома в виде множественных экхимозов и гематом различной давности, проявлениями atopического дерматита, течением инфекционного процесса: экссудативного левостороннего отита, острого гнойного ринита.

Из анамнеза известно, что мальчик рожден от 2-й беременности (1-я – мед. аборт), первых оперативных родов. С раннего возраста отмечались геморрагический синдром (кровоточивость десен, сыпь в виде петехий и экхимозов по всей поверхности тела), инфекционные проявления в виде деструктивной правосторонней пневмонии, осложненной плевритом, частые эпизоды инфекций верхних дыхательных путей, рецидивирующие стоматиты. Кроме того, с первых месяцев жизни была отмечена тромбоцитопения с минимальными значениями тромбоцитов – до 74 тыс./мкл. Развитие клинических проявлений у пациента суммированы в таблице 1.

Таблица 1

Развитие клинических проявлений и использованные методы лечения у пациента с реверсной мутацией в гене *WAS*

Параметр	1 год 3 мес.	1 год 4 мес.	2 года
Жалобы	Лихорадка, кашель	Геморрагический синдром	Геморрагический синдром, atopический дерматит, экссудативный левосторонний отит, острый гнойный ринит
Исследования		Тромбоциты до 74 тыс./мкл	Тромбоциты – до 10 тыс./мкл CMV-виремия – 39 коп./мл ЦРБ – 25,2 мг/л Сниженная экспрессия белка WASP лимфоцитами с бимодальным распределением
Диагноз	Деструктивная правосторонняя пневмония, осложненная плевритом	ИТП?	Первичный комбинированный иммунодефицит: синдром Вискотта–Олдрича (мутация в гене <i>WAS</i> с.11dupG)
Лечение	Антибактер. терапия, установка дренажа	ВВИГ 1 г/кг Тромбоконцентрат Пулс-терапия ГКС с ответом, при отмене – рецидив	Ромиплостим ВВИГ Антибактер. терапия Противовирусная терапия

По данным лабораторного обследования в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева у пациента выявлены тромбоцитопения – до 10 тыс./мкл со сниженным объемом тромбоцитов (таблица 2), повышение IgA (таблица 3). Уровень С-реактивного белка был повышен до 25,2 мг/л в связи с течением инфекционного процесса. По данным иммунофенотипирования лейкоцитов значимых отклонений от нормы не выявлено.

Таблица 2
Общий анализ крови у пациента с реверсной мутацией в гене WAS

Показатель	Значение
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	13,05
Эритроциты, 10 ⁹ /л	4,05
Гемоглобин, г/л	110
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	10
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	6,47
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	4,88
СОЭ, мм/ч	4

Таблица 3
Сывороточные иммуноглобулины у пациента с реверсной мутацией в гене WAS

Показатель	Значение
IgA	1,53 (0,1–1,0)
IgM	1,41 (0,6–1,8)
IgG	9,46 (4,6–14,6)

При проведении других лабораторных и инструментальных видов исследований, костномозговой пункции значимых отклонений также не наблюдалось.

При молекулярно-генетическом обследовании была выявлена мутация в гене WAS с.11dupG, p.Met6AsnfsTer32 (M6Nfs*32), что подтвердило диагноз «синдром Вискотта–Олдрича». По совокупности клинико-лабораторных данных оценка по шкале тяжести СВО соответствовала 4 баллам [57].

При определении внутриклеточной экспрессии белка WASP лимфоцитами было обнаружено ее снижение и бимодальное распределение, преимущественно в популяции CD8+ лимфоцитов (рисунок 1).

Так как экспрессия белка WASP имела нетипичную картину для СВО, с целью определения природы данного явления была выделена популяция CD8+ лимфоцитов и проведено дополнительное секвенирование гена WAS, в результате которого выявлена реверсная мутация в гене WAS с.2T>G, p.Met1Arg (рисунок 2).

Рисунок 1

Определение внутриклеточной экспрессии белка WASP лимфоцитами методом проточной цитометрии

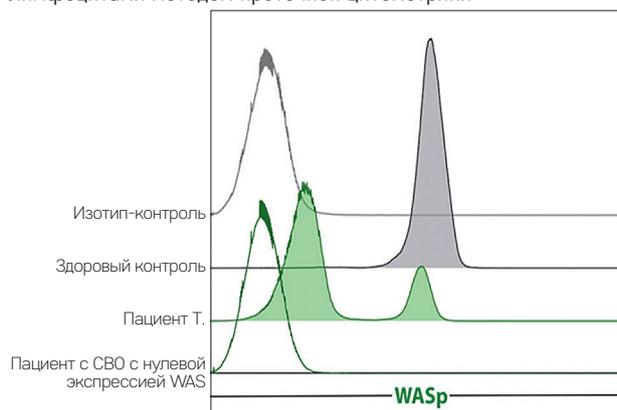
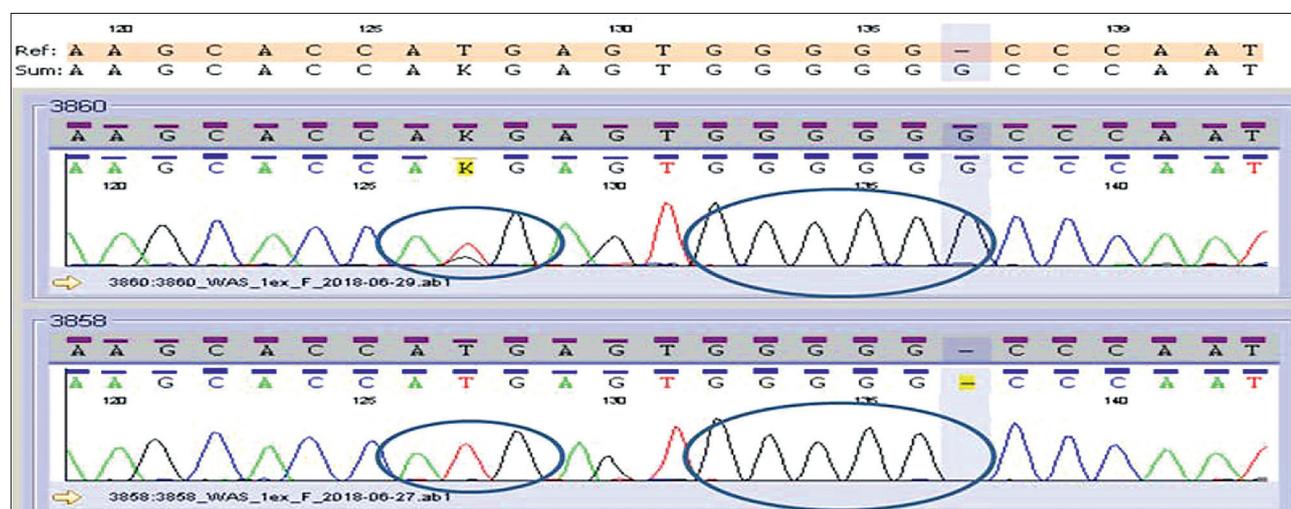


Рисунок 2

Молекулярно-генетическое исследование (секвенирование по Сенгеру) пациента с реверсной мутацией: верхняя панель – результат секвенирования гена WAS на ДНК пациента, выделенной из популяции CD8+ лимфоцитов с положительной экспрессией WASP; нижняя панель – результат секвенирования ДНК здорового донора; овалами обведены позиции герминальной мутации (дупликация G, с.11dupG) и реверсной соматической мутации (замена в стартовом кодоне, с.2T>G)



Поскольку герминальная мутация в гене *WAS* с.11dupG к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации трансляции, синтез белка WASP полностью инактивируется. В свою очередь соматическая мутация в гене *WAS* с.2T>G в 1-й позиции приводит к исчезновению старт-кодона. В результате рибосома проходит данное положение и движется далее по мРНК в поисках следующего старт-кодона, который находится в 6-й позиции. В итоге происходит сдвиг открытой рамки считывания и инициируется синтез белка WASP, укороченного на 5 аминокислот (рисунок 3). Поскольку укорочение произошло в N-концевой части и функциональные домены белка не были затронуты, функция белка в данной популяции предположительно не страдает. Важно отметить, что при повторном исследовании экспрессии белка WASP через 6 мес. было обнаружено, что популяция реверсных CD8+ Т-лимфоцитов увеличилась до 29% (рисунок 4).

Несмотря на то что у пациента имеет место синтез практически полноценного белка WASP, реверс-

ная мутация затронула небольшой пул клеток, что, возможно, не повлияло на фенотип: клинически у пациента наблюдалось среднетяжелое течение заболевания.

14.03.2019 ребенку была проведена успешная аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от гаплоидентичного донора (отца) с TCR/ab деплецией – это единственный доступный куративный метод лечения основного заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный клинический пример демонстрирует пациента с синдромом Вискотта–Олдрича с реверсивной мутацией, практически полностью восстанавливающей нормальный синтез белка, однако не повлиявшей на тяжесть заболевания и необходимость проведения куративного лечения (ТГСК). Возможно, это подтверждает гипотезу о селективном преимуществе реверсных популяций клеток.

Рисунок 3

Схема инициации трансляции белка WASP в норме (верхняя панель) и при наличии герминальной и реверсной мутации у пациента Т. (нижняя панель)

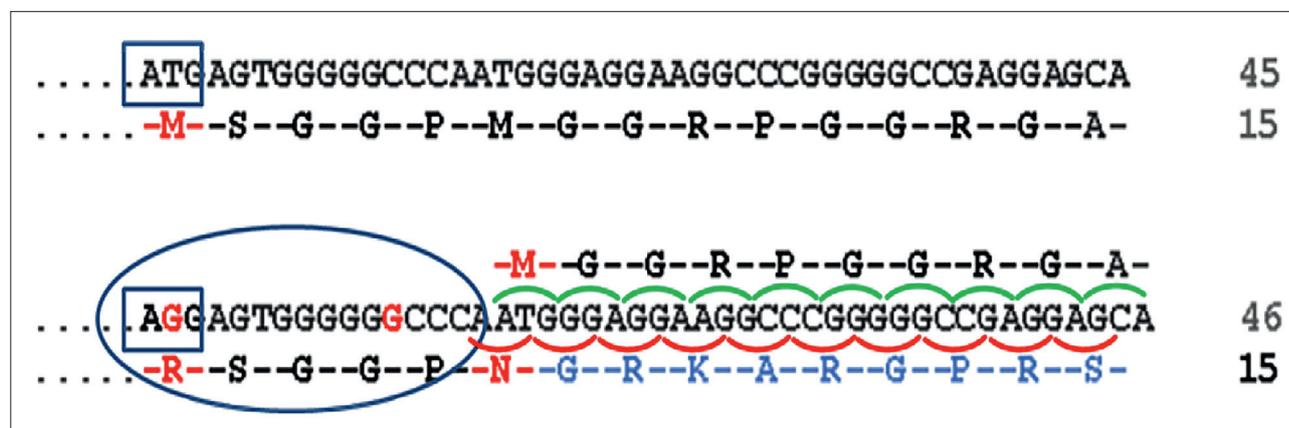
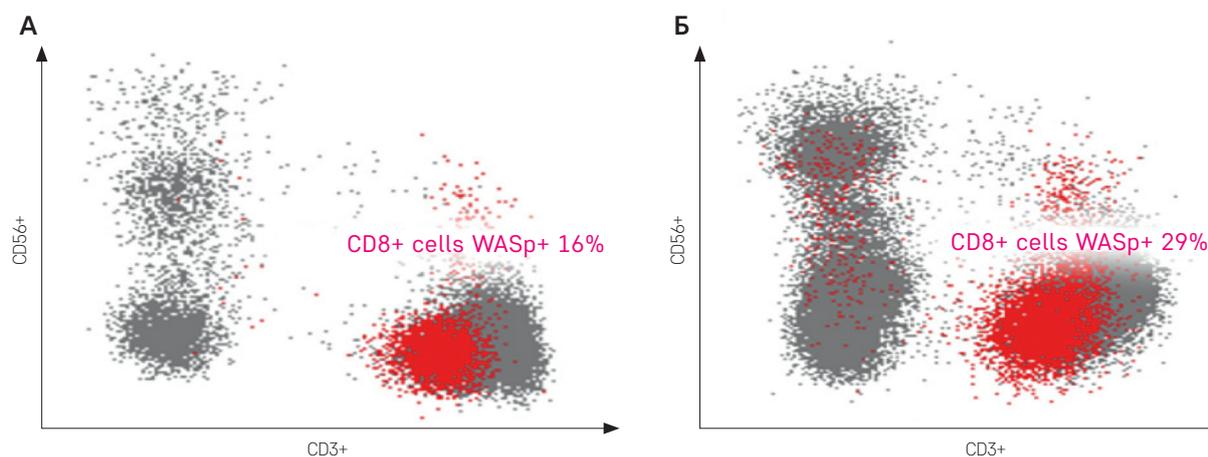


Рисунок 4

Определение внутриклеточной экспрессии белка WASP лимфоцитами: популяция CD8+ лимфоцитов с синтезом белка WASP увеличилась с 16% (А) до 29% (Б)



МНЕНИЕ ЭКСПЕРТА

А.Ю. Щербина, профессор, заведующая отделением иммунологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Хотя реверсный мозаицизм на данный момент явление малоизученное, анализ мировой литературы показал, что имеющееся разнообразие генетических изменений, которое может привести к появлению реверсных клеток, ставит под сомнение общепринятую гипотезу о том, что такие события чрезвычайно редки. Современные рутинные исследования, такие как исследование экспрессии различных белков методом проточной цитометрии и секвенирование нового поколения, позволили выявить большое количество случаев РМ у пациентов с первичными иммунодефицитами.

На сегодняшний день нет точного объяснения механизма появления РМ при наследственных заболеваниях. Возможно, это гетерогенный процесс, поскольку трудно объяснить огромное разнообразие вариаций реверсий, а также высокую распространенность РМ при синдроме Вискотта–Олдрича по сравнению с другими иммунодефицитами.

Данные различных клинических исследований и опыт нашего наблюдения показали, что клинические последствия РМ переменны – от отсутствия какого-либо влияния на фенотип заболевания до появления атипичных клинических форм, что может затруднять диагностику и своевременное лечение заболевания. Так, у пациентов с СВР реверсии ни в одном из описанных случаев не являлись куративными, в то время как у пациентов с ТКИН наблюдалось не только более легкое течение заболевания, но и атипичный, характерный для другой формы ПИД, фенотип.

Предполагается, что это связано с различными факторами, которые включают изначальную патогенную мутацию, тип реверсии, вид и количество клеточных линий, подвергшихся РМ, степень функционального восстановления этих клеток, а также их процентное содержание от общего числа.

Важным фактом, обнаруженным при анализе описанных клинических случаев, в том числе приведенного выше, является феномен селективного преимущества реверсной популяции клеток, поскольку в большинстве случаев с течением времени она имела тенденцию к увеличению, вплоть до 80%. Это важно учитывать при разработке протоколов генной терапии соответствующих ПИД, так как потенциально не при всех видах иммунодефицитов клетки с коррекцией дефекта имеют преимущественное выживание. Исследование реверсного мозаицизма может дать ключ к пониманию факторов, влияющих на успех генной терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Nesterenko Z.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4427-054X>
Kuzmenko N.B. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1669-8621>
Burlakov V.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1267-9957>
Victorova E.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2427-1417>
Vedmedskaya V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Kieva A.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2467-2840>
Mersiyanova I.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0471-2956>
Varlamova T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0501-8686>
Raykina E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7634-2053>
Deripapa E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9083-4783>

Литература

1. Bousfiha A., Jeddane L., Picard C., Ailal F., Gaspar B.H., Al-Herz W., et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2018; 38 (1): 129. DOI: 10.1007/s10875-017-0465-8
2. Okuno Y., Hoshino A., Muramatsu H., Kawashima N., Wang X., Yoshida K., et al. Late-onset combined immunodeficiency with a Novel IL2RG mutation and probable revertant somatic mosaicism. *J Clin Immunol* 2015; 35: 610–4. DOI: 10.1007/s10875-015-0202-0
3. Gajicka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Mol Genet Genomics* 2016; 291: 513–30. DOI: 10.1007/s00438-015-1130-7
4. Lai-Cheong J.E., McGrath J.A., Uitto J. Revertant mosaicism in skin: natural gene therapy. *Trends Mol Med* 2011; 17: 140–8. DOI: 10.1016/j.molmed.2010.11.003
5. Forsberg L.A., Gisselsson D., Dumaniski J.P. Mosaicism in health and disease – clones picking up speed. *Nat Rev Genet* 2017; 18 (2): 128–42. DOI: 10.1038/nrg.2016.145
6. Stewart D.M., Candotti F., Nelson D.L. The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott–Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics Working Party at the XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4–7, 2006. *J Clin Immunol* 2007; 27: 634–9. DOI: 10.1007/s10875-007-9121-z
7. Kuijpers T.W., van Leeuwen E.M., Barendregt B.H., Klarenbeek P. van de Kerk D.J., Baars P.A., et al. A reversion of an

- IL2RG mutation in combined immunodeficiency providing competitive advantage to the majority of CD8+ T cells. *Haematologica* 2013; 98: 1030–8. DOI: 10.3324/haematol.2012.077511
8. Wada T., Candotti F. Somatic mosaicism in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8 (6): 510–4. DOI: 10.1097/ACI.0b013e328314b651
 9. Yang T.P., Stout J.T., Konecki D.S., Patel P.I., Alford R.L., Caskey C.T. Spontaneous reversion of novel Lesch–Nyhan mutation by HPRT gene rearrangement. *Somat Cell Mol Genet* 1988; 14: 293–303.
 10. Jonkman M.F. Revertant mosaicism in human genetic disorders. *Am J Med Genet* 1999; 85: 361–4.
 11. Hirschhorn R. In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. *J Med Genet* 2003; 40: 721–8.
 12. Hirschhorn R., Yang D.R., Israni A., Huie M.L., Ownby D.R. Somatic mosaicism for a newly identified splice-site mutation in a patient with adenosine deaminase-deficient immunodeficiency and spontaneous clinical recovery. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 59–68.
 13. Wada T. Revertant somatic mosaicism in primary immunodeficiency diseases. *Jpn J Clin Immunol* 2014; 37 (6): 447–53. DOI: 10.2177/jsci.37.447
 14. Ariga T., Yamada M., Sakiyama Y., Tatsuzawa O. A case of Wiskott–Aldrich syndrome with dual mutations in exon 10 of the WASP gene: an additional de novo one-base insertion, which restores frame shift due to an inherent one-base deletion, detected in the major population of the patient's peripheral blood lymphocytes. *Blood* 1998; 92: 699–701.
 15. Ariga T., Kondoh T., Yamaguchi K., Yamada M., Sasaki S., Nelson D.L., et al. Spontaneous in vivo reversion of an inherited mutation in the Wiskott–Aldrich syndrome. *J Immunol* 2001; 166: 5245–9.
 16. Wada T., Schurman S.H., Otsu M., Garabedian E.K., Ochs H.D., Nelson D.L., Candotti F. Somatic mosaicism in Wiskott–Aldrich syndrome suggests in vivo reversion by a DNA slippage mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8697–702.
 17. Wada T., Schurman S.H., Jagadeesh G.J., Garabedian E.K., Nelson D.L., Candotti F. Multiple patients with revertant mosaicism in a single Wiskott–Aldrich syndrome family. *Blood* 2004; 104: 1270–2.
 18. Wada T., Konno A., Schurman S.H., Garabedian E.K., Anderson S.M., Kirby M., et al. Second-site mutation in the Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest* 2003; 111: 1389–97.
 19. Konno A., Wada T., Schurman S.H., Garabedian E.K., Kirby M., Anderson S.M., et al. Differential contribution of Wiskott–Aldrich syndrome protein to selective advantage in T- and B-cell lineages. *Blood* 2004; 103: 676–8.
 20. Lutskiy M.I., Beardsley D.S., Rosen F.S., Remold-O'Donnell E. Mosaicism of NK cells in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome. *Blood* 2005; 106: 2815–7.
 21. Du W., Kumaki S., Uchiyama T., Yachie A., Yeng Looi C., Kawai S., et al. A second-site mutation in the initiation codon of WAS (WASP) results in expansion of subsets of lymphocytes in an Wiskott–Aldrich syndrome patient. *Hum Mutat* 2006; 27: 370–5.
 22. Humblet-Baron S., Sather B., Anover S., Becker-Herman S., Kasprovicz D.J., Khim S., et al. Wiskott–Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest* 2007; 117: 407–18.
 23. Boztug K., et al. Large granular lymphocyte proliferation and revertant mosaicism: two rare events in a Wiskott–Aldrich syndrome patient. *Haematologica* 2007; 92: e43–5.
 24. Davis B.R., Dicola M.J., Prokopishyn N.L., Rosenberg J.B., Moratto D., Muul L.M., et al. Unprecedented diversity of genotypic revertants in lymphocytes of a patient with Wiskott–Aldrich syndrome. *Blood* 2008; 111: 5064–7.
 25. Davis B.R., Yan Q., Bui J.H., Felix K., Moratto D., Muul L.M., et al. Somatic mosaicism in the Wiskott–Aldrich syndrome: molecular and functional characterization of genotypic revertants. *Clin Immunol* 2010; 135: 72–83.
 26. Boztug K., Germeshausen M., Avdilto Diez I., Gulacsy V., Diestelhorst J., Ballmaier M., et al. Multiple independent second-site mutations in two siblings with somatic mosaicism for Wiskott–Aldrich syndrome. *Clin Genet* 2008; 74: 68–74.
 27. Lutskiy M.I., Park J.Y., Remold S.K., Remold-O'Donnell E. Evolution of highly polymorphic T cell populations in siblings with the Wiskott–Aldrich Syndrome. *PLoS ONE* 2008; 3: e3444.
 28. Trifari S., Scaramuzza S., Catucci M., Ponzoni M., Mollica L., Chiesa R., et al. Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome: analysis of function and distribution in lymphoid organs. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 439–48, e8.
 29. Xie J.W., Zhang Z.Y., Wu J.F., Liu D.W., Liu W., Zhao Y., et al. In vivo reversion of an inherited mutation in a Chinese patient with Wiskott–Aldrich syndrome. *Hum Immunol* 2015; 76 (6): 406–13. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.04.001
 30. Hirschhorn R., Yang D.R., Puck J.M., Huie M.L., Jiang C.K., Kurlandsky L.E. Spontaneous in vivo reversion to normal in an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat Genet* 1996; 13: 290–5.
 31. Ariga T., Oda N., Yamaguchi K., Kawamura N., Kikuta H., Taniuchi S., et al. T-cell lines from 2 patients with adenosine deaminase (ADA) deficiency showed the restoration of ADA activity resulted from the reversion of an inherited mutation. *Blood* 2001; 97: 2896–9.
 32. Arredondo-Vega F.X., Santisteban I., Richard E., Bali P., Koleilat M., Loubser M., et al. Adenosine deaminase deficiency with mosaicism for a “second-site suppressor” of a splicing mutation: decline in revertant T-lymphocytes during enzyme replacement therapy. *Blood* 2002; 99: 1005–13.
 33. Liu P., Santisteban I., Burroughs L.M., Ochs H.D., Torgerson T.R., Hershfield M.S., et al. Immunologic reconstitution during PEG-ADA therapy in an unusual mosaic ADA deficient patient. *Clin Immunol* 2009; 130: 162–74.
 34. Moncada-Velez M., Vélez-Ortega A., Orrego J., Santisteban I., Jagadeesh J., Olivares M., et al. Somatic mosaicism caused by monoallelic reversion of a mutation in T-cells of a patient with ADA-SCID and the effects of enzyme replacement therapy on the revertant

- phenotype. *Scand J Immunol* 2011; 74: 471–81.
35. Stephan V., Wahn V., Le Deist F., Dirksen U., Broker B., Müller-Fleckenstein I., et al. Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T-cells. *New Engl J Med* 1996; 335: 1563–7.
 36. Bousso P., Wahn V., Douagi I., Horneff G., Pannetier C., Le Deist F., et al. Diversity, functionality, and stability of the T-cell repertoire derived in vivo from a single human T-cell precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 274–8.
 37. Wada T., Yasui M., Toma T., Nakayama Y., Nishida M., Shimizu M., et al. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. *Blood* 2008; 112: 1872–5.
 38. Speckmann C., Pannicke U., Wiech E., Schwarz K., Fisch P., Friedrich W., et al. Clinical and immunologic consequences of a somatic reversion in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 2008; 112: 4090–7.
 39. Kawai T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Izawa K., Murakami T., et al. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T-cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol* 2012; 32: 690–7.
 40. Hsu A.P., Pittaluga S., Matinez B., Rump A.P., Raffeld M., Uzel G., et al. IL2RG version event in a common lymphoid progenitor leads to delayed diagnosis and milder phenotype. *J Clin Immunol* 2015; 35 (5): 449–53.
 41. Wada T., Toma T., Okamoto H., Kasahara Y., Koizumi S., Agematsu K., et al. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 2005; 106: 2099–101.
 42. Crestani E., Choo S., Frugoni F., Lee Y.N., Richards S., Smart J., et al. RAG1 reversion mosaicism in a patient with omenn syndrome. *J Clin Immunol* 2014; 34: 551–4.
 43. Rieux-Laucat F., et al. Inherited and somatic CD3 ζ mutations in a patient with T-cell deficiency. *New Engl J Med* 2006; 354: 1913–21.
 44. Nishikomori R., Akutagawa H., Maruyama K., Nakata-Hizume M., Ohmori K., Mizuno K., et al. X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood* 2004; 103: 4565–72.
 45. Mizukami T., Obara M., Nishikomori R., Kawai T., Tahara Y., Sameshima N., et al. Successful treatment with infliximab for inflammatory colitis in a patient with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2012; 32: 39–49.
 46. Kawai T., Nishikomori R., Izawa K., Murata Y., Tanaka N., Sakai H., et al. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T-cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood* 2012; 119: 5458–66.
 47. Tone Y., Wada T., Shibata F., Toma T., Hashida Y., Kasahara Y., et al. Somatic revertant mosaicism in a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. *Blood* 2007; 109: 1182–4.
 48. Uzel G., Tng E., Rosenzweig S.D., Hsu A.P., Shaw J.M., Horwitz M.E., et al. Reversion mutations in patients with leukocyte adhesion deficiency type-1 (LAD-1). *Blood* 2008; 111: 209–18.
 49. Palendira U., Low C., Bell A.I., Ma C.S., Abbott R.J., Phan T.G., et al. Expansion of somatically reverted memory CD8+ T-cells in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by selective pressure from Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 2012; 209: 913–24.
 50. Jing H., Zhang Q., Zhang Y., Hill B.J., Dove C.G., Gelfand E.W., et al. Somatic reversion in dedicator of cytokinesis 8 immunodeficiency modulates disease phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 1667–75.
 51. Ochs H.D., Filipovich A.H., Veys P., Cowan M.J., Kapoor N. Wiskott–Aldrich syndrome: Diagnosis, clinical and laboratory manifestations, and treatment. *BiolBloodMarrowTranspl* 2009; 15: 84–90.
 52. Candotti F. Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott–Aldrich Syndrome. *J Clin Immunol* 2017; 38 (1): 1–15.
 53. Notarangelo L.D., Miao C.H., Ochs H.D. Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 30–6.
 54. Sarkar K., Han S.-S., Wen K.-K., Ochs H.D., Dupré L., Seidman M.M., Vyas Y.M. R-loops cause genomic instability in Wiskott–Aldrich syndrome T-helper lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018; 142 (1): 219–34. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.11.023
 55. Davis B.R., Candotti F. Revertant somatic mosaicism in the Wiskott–Aldrich syndrome. *Immunol Res* 2009; 44: 127–31.
 56. Jin Y., Mazza C., Christie J.R., Giliani S., Fiorini M., Mella P., et al. Mutations of the Wiskott–Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 2004; 104: 4010–9.
 57. Zhu Q., Zhang M., Blaese R.M., Derry J.M., Junker A., Francke U., et al. The Wiskott–Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood* 1995; 86 (10): 3797–804.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 24.12.2018

Принята к печати 08.04.2019

Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики

Е.А. Пономаренко^{1,2}, А.А. Игнатова¹, Д.В. Федорова¹, П.А. Жарков¹, М.А. Пантелеев^{1,2,3,4}¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва³ ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва⁴ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва

Контактная информация:

Пономаренко Евгения Александровна,
мл. науч. сотрудник лаборатории
клеточного гемостаза и тромбоза
НМИЦ детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: pappe@bk.ru

Тромбоциты выполняют многочисленные важные функции не только в процессах нормального функционирования системы гемостаза, но и в других физиологических процессах: регуляции целостности сосудистой стенки, регенерации повреждений, воспалительном ответе. Нарушение их работоспособности происходит при многих заболеваниях и состояниях (включая онкогематологические, воспалительные, аутоиммунные заболевания, солидные опухоли, сепсис), провоцируется травмами, лекарственными препаратами и может вести к опасным последствиям – кровоизлияниям и тромбозам. Однако инструменты для оценки функциональной активности тромбоцитов крайне ограничены, да и представление о том, что такое функциональная активность тромбоцита, не достаточно четкое. В данном обзоре рассмотрены функции тромбоцитов, их нарушения, возможности их оценки существующими методами, а также перспективные направления их развития.

Ключевые слова: функция тромбоцитов, гемостаз, проточная цитометрия, кровотечение, тромбоз, тромбоцитопения

Пономаренко Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 112–119.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119

© 2019 by NMRC PHOI

Received 24.12.2018

Accepted 08.04.2019

Platelet functional activity: physiology and laboratory diagnostic methods

E.A. Ponomarenko^{1,2}, A.A. Ignatova¹, D.V. Fedorova¹, P.A. Zharkov¹, M.A. Panteleev^{1,2,3,4}¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow² M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow³ Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow

Platelets perform numerous important functions not only in the process of normal functioning of hemostatic system, but also in other physiological processes, such as: vessel wall integrity regulation, wound healing, inflammatory response. Its malfunction can be found in various diseases and conditions (including oncohematological disorders, solid tumors, inflammatory diseases, sepsis, autoimmune disorders), is triggered by injury or medications and can lead to dangerous consequences, such as bleeding and thrombosis. However, platelets functional activity quantity assessment tools are extremely limited, the perception what platelet functional activity is about is also quite unclear. This review considers platelets function, its' abnormalities, possibilities for its' assessment by existing methods as well as promising directions for their development.

Key words: platelets function, hemostasis, flow cytometry, bleeding, thrombosis, thrombocytopenia

Ponomarenko E.A., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 112–119.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119

В оценке роли тромбоцитов в современной медицине существует некий парадокс. С одной стороны, важность их роли несомненна: при многих состояниях, заболеваниях, влиянии патогенных факторов, выполнении ряда процедур нарушение функционирования тромбоцитов приводит к тяжелым последствиям (например, при онкогематологических заболеваниях [1], сепсисе [2], травмах [3], у недоношенных новорожденных [4]). С другой стороны, в подавляющем большинстве случаев паци-

енту назначают общий анализ крови, дающий представление лишь о количестве тромбоцитов. Тесты функциональной активности тромбоцитов назначают только при наследственных дефектах их функции и проводят в специализированных диагностических центрах.

В настоящем обзоре освещена проблема оценки функциональной активности тромбоцитов и рассмотрены перспективные направления развития в этой области.

Физиология гемостаза: что такое функциональная активность тромбоцитов?

Представления о механизмах гемостаза были существенно пересмотрены за последние 10 лет. Гемостазом называют совокупность всех физиологических процессов, обеспечивающих остановку кровотечения при ранениях, ушибах, нарушении целостности межклеточных контактов сосудистой стенки и любых других ситуациях, связанных с кровотечениями и кровоизлияниями, поддержание реологии крови и растворение тромбов, выполнивших свою функцию. В зависимости от типа кровотечения возможны различные сценарии развития дальнейших событий.

Классический гемостаз при ранении включает три основных механизма: вазоконстрикция, формирование тромбоцитарного агрегата и формирование фибринового сгустка в результате активации каскада свертывания [5]. Тромбоциты полностью реализуют второй пункт и играют важные роли в двух других – и вазоконстрикция, и свертывание крови в огромной степени регулируются тромбоцитами. Формирование патологических тромбов, происходящее в отсутствие повреждения сосудистой стенки, по-видимому, проходит по сценариям, не вполне совпадающим с формированием тромбов в случае повреждения сосудистой стенки при нормальной работе системы гемостаза [6]. Кроме того, есть ряд негемостатических функций тромбоцита (участие в процессах ангиогенеза [7], воспаления [8], регенерации [9]), которые не обсуждаются в данном обзоре.

Тромбоцитарный гемостаз. Основные этапы классического гемостаза: торможение тромбоцитов в месте повреждения, их активация, стабилизация первичной адгезии, торможение новых тромбоцитов при столкновении с уже прикрепившимися тромбоцитами, их активация и стабилизация получившегося агрегата.

После повреждения сосудистой стенки белки субэндотелиального матрикса приходят в контакт с кровью. Циркулирующий в крови фактор Виллебранда связывается с коллагеном и разворачивается потоком крови, работая как механосенсор и «тормозной канат» для тромбоцитов. Тромбоциты связываются с фактором Виллебранда через адгезионный рецептор гликопротеин (ГП) Iba [10]. Это взаимодействие достаточно слабое, оно позволяет тромбоцитам медленно (1–4 мкм/сек) катиться по месту повреждения, но не дает стабильной адгезии [11]. После этого первичного шага происходит активация тромбоцитов (предположительно, с помощью коллагенового рецептора ГП VI) [10, 12]. Это ведет к активации рецепторов-интегринов, которые поддерживают стабильность адгезии за счет связывания со своими лигандами на стенке сосуда (интегрин α IIb β 3 – с фактором Виллебранда, интегрин α 5 β 1 –

с фибронектином, интегрин α 2 β 1 – с коллагеном) [13].

Дальнейший рост тромбоцитарного агрегата происходит по той же схеме адгезии, что и его инициация: стабильно закрепленные тромбоциты связывают из крови фактор Виллебранда, а новые тромбоциты связываются с ним. Разница состоит только в том, что активация происходит не от коллагена (так как он закрыт первым слоем тромбоцитов), а от растворимых активаторов аденозиндифосфата (АДФ) и тромбоксана A2 (ТХА2), которых тромбоциты выбрасывают при активации. Стабильная адгезия достигается преимущественно благодаря α IIb β 3, соединяющему тромбоциты через фибриногеновые «мостики». Дополнительно остановку кровотечения обеспечивает вазоконстрикция, вызванная ТХА2 и серотонином, секретлируемыми из тромбоцитов [14].

Наконец, активация свертывания крови обеспечивает формирование прочного гемостатического барьера из фибринового геля. Тромбоциты участвуют в свертывании крови тремя способами: экспонирование прокоагулянтной поверхности [15], секреция фактора V из α -гранул [16] и прямая активация свертывания по контактному пути [17].

Активация тромбоцитов. Поскольку активация тромбоцита – критический компонент его физиологии, ее следует рассмотреть отдельно. Взаимодействие ГП VI с субэндотелиальным коллагеном вызывает формирование активационного сигнала и передачу его внутрь тромбоцитов с помощью системы вторичных посредников. В результате происходит мобилизация ионов кальция из внутриклеточных мест хранения – плотной тубулярной системы. Кальций участвует в различных процессах внутриклеточной сигнализации, а также приводит к выходу отрицательно заряженных фосфолипидов на поверхность тромбоцитов. Отрицательный заряд внешнего слоя мембраны необходим для превращения протромбина в тромбин через каскад свертывания [18].

Кроме того, происходит экзоцитоз содержимого α - и плотных гранул. Выброшенные вещества, в свою очередь, по принципу обратной связи воздействуют на свои рецепторы на поверхности тромбоцитов, усиливая их активацию, а также активируют соседние покоящиеся тромбоциты. Еще один способ привлечения тромбоцитов – синтез ТХА2 *de novo*. Пожалуй, самый наглядный результат активации тромбоцитов – это изменение их формы с дискоидной на сферическую с образованием множества псевдоподий, которое происходит за счет реорганизации актинового цитоскелета [19].

Наконец, активация тромбоцитов приводит к конформационному переходу ГП IIb/IIIa из неактивной в активную форму, в результате чего он получает способность связывать растворимый фибриноген плазмы крови [20].

Нарушение функции тромбоцитов: что важно?

Практически на все перечисленные выше функции тромбоцита могут оказывать влияние генетические нарушения, приобретенные заболевание, травмы и терапевтические воздействия. При генетических нарушениях дефекты функций тромбоцитов могут быть как изолированными (тромбастения Гланцмана, обусловленная дефицитом интегрин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$), так и сочетанными (нарушения сигнальных путей, ведущие к дефектам активации) [21]. Лекарственные воздействия (например, ингибирование активации тромбоцитов ибрутинином) подавляют широкий круг тромбоцитарных функций, зависящих от активации коллагеном. Нарушения функции тромбоцитов у недоношенных новорожденных, при травмах, аутоиммунных и онкогематологических заболеваниях обычно носят комплексный характер и могут быть связаны в том числе и с рефрактерностью или преаггированностью.

Нарушения функций тромбоцитов неразрывно связаны с проблемой их концентрации: нормальный диапазон составляет 150–450 тыс. в микролитре; тромбоцитопению диагностируют (с оговорками) при значениях менее 100 тыс./мкл, но граница клинических проблем в большинстве случаев лежит в области ниже 30 тыс./мкл. Таким образом, в среднем у человека в 10 раз больше тромбоцитов, чем необходимо. Можно предположить, что благодаря этому в значительной степени сглаживаются дефекты тромбоцитов. Это ведет к тому, что большая часть врожденных изолированных нарушений функции тромбоцитов, даже относительно серьезных, таких как тромбастения Гланцмана (отсутствие ведущего рецептора агрегации), имеет мягкий и редко угрожающий жизни фенотип кровотечений. При неизолированных нарушениях это приводит к тому, что клинически значимые дефекты функции тромбоцитарного гемостаза в подавляющем большинстве случаев оказываются комбинацией собственно дефекта тромбоцитов и снижения их концентрации. Это одна из самых серьезных проблем при использовании агрегометрии, которая не работает при низких концентрациях тромбоцитов.

Практически все перечисленные выше функции требуют оценки для определения состояния тромбоцитарного гемостаза. И эту задачу следует отделять от задачи постановки диагноза. Исключение составляют те случаи, когда нарушение функции тромбоцитов (как правило, генетическое) напрямую и однозначно связано с заболеванием, при этом оценка тромбоцитарной функции может помочь поставить диагноз. В большинстве случаев ситуация обратная: диагноз уже установлен и не связан с тромбоцитами, нарушение функции которых происходит в ответ на терапию заболевания (например, при лечении хронического

лимфоцитарного лейкоза ибрутинином [22], который является обратимым ингибитором тирозинкиназы Брутона). Несмотря на высокую эффективность и хорошую переносимость этого препарата, у большого числа пациентов в качестве побочного эффекта возникают кровотечения, в основном на слизистых оболочках и коже [23]. Было показано, что этот препарат нарушает активацию тромбоцитов *in vitro* [24]; отмечено также, что у пациентов нарушен ответ тромбоцитов на коллаген и снижена адгезия к фактору Виллебранда *ex vivo* [25]. В этом случае определение функциональной активности тромбоцитов необходимо для оценки рисков кровотечений и контроля терапии.

Методы лабораторной диагностики функциональной активности тромбоцитов

Существует большое разнообразие методов лабораторной диагностики, позволяющих оценить гемостатические функции тромбоцитов. Золотым стандартом считается метод оптической агрегометрии, который позволяет *in vitro* оценить способность тромбоцитов к агрегации за счет их соединения друг с другом с помощью ГП IIb/IIIa. В качестве среды используется обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) [26]. В состоянии покоя тромбоциты распределены в плазме однородно, при этом наблюдается максимальная оптическая плотность. Добавление агониста приводит к активации тромбоцитов, что в свою очередь вызывает изменение их формы, в результате чего оптическая плотность плазмы падает. При образовании тромбоцитарных агрегатов оптическая плотность плазмы падает, а светопропускание возрастает. В зависимости от используемых агонистов агрегация может быть необратимой, при этом кривая агрегации выходит на плато, либо обратимой, тогда кривая стремится вернуться к исходным значениям. Использование различных агонистов позволяет выявить разнообразные нарушения функции тромбоцитов.

Наиболее частые агонисты агрегации тромбоцитов в оптической агрегометрии – АДФ, адреналин, коллаген, арахидоновая кислота и ристоцетин. Слабые агонисты вызывают агрегацию без секреции гранул (например, АДФ), а сильные (например, коллаген) – и агрегацию, и секрецию гранул.

Ристоцетин облегчает связывание фактора Виллебранда с комплексом ГП IIb/IX/V. Для нормального результата необходимо присутствие функционального фактора Виллебранда и комплекса ГП IIb/IX/V. Таким образом, агрегация тромбоцитов с ристоцетином позволяет выявить как болезнь Виллебранда, так и нарушения функций тромбоцитов (например, синдром Бернара–Суллье) [27]; агрегация с коллагеном – недостаточность секреции тромбоцитов, а агрегация

с адреналином позволяет определить гиперреактивность тромбоцитов. Агрегация с обоими агонистами в низких дозах применяется для мониторинга лечения аспирином и антагонистами P2Y₁₂ рецепторов [28].

Среди недостатков метода можно назвать необходимость подготовки пробы с ОТП. Кроме того, использование оптических агрегометров затруднено при малом количестве тромбоцитов, например, при иммунной тромбоцитопенической пурпуре (ИТП) в связи с низкой оптической плотностью плазмы. Мелкие агрегаты из малого количества тромбоцитов можно обнаружить с помощью лазерного агрегометра. Прибор определяет изменение оптической плотности ОТП и средний размер агрегата, что дает возможность оценить способность тромбоцитов к активации и агрегации. Высокая чувствительность метода позволяет использовать его при исследовании агрегации при действии низких концентраций агонистов [29].

Оптическая многоканальная агрегометрия в 96-луночном планшете (*Optimul*) имеет тот же принцип работы, что и оптическая агрегометрия. Панель агонистов (АДФ, агонист рецептора тромбина TRAP-6, адреналин, арахидоновая кислота и ристоцетин) в разных концентрациях добавляют в отдельные лунки 96-луночного планшета для микротитрования. В ходе анализа в лунки к агонистам добавляют ОТП, и помещают планшет в считыватель для определения величины светопропускания плазмы [30]. Метод позволяет одновременно анализировать большее, чем в оптической агрегометрии, количество образцов, а также расширить панель используемых агонистов и их концентраций [31]. На сегодняшний день этот метод недостаточно стандартизован и применяется только в специализированных лабораториях [30, 32].

В методе импедансной агрегометрии, в отличие от оптической агрегометрии, в качестве среды используют цельную кровь. При этом, во-первых, отпадает необходимость проведения предварительной подготовки образцов, а во-вторых, оценка функции тромбоцитов проводится в более физиологичных условиях. При добавлении в среду агониста происходит образование агрегатов с тромбоцитами, осажденными на электродах агрегометра, что, в свою очередь, приводит к увеличению сопротивления (импеданса) системы. Способность тромбоцитов к агрегации оценивают на основе оценки изменения импеданса [33].

В тех случаях, когда нет возможности обратиться в лабораторию, используют устройства, позволяющие быстро оценить способность тромбоцитов к агрегации в цельной крови. К таким устройствам относятся системы *VerifyNow* (ITC, США) и *Plateletworks* (*Helena Laboratories*, США), имеющие сходный принцип работы. В системе *VerifyNow* тромбоциты под действи-

ем агонистов агрегируют на картридж с шариками, покрытыми фибриногеном, пропорционально числу активированных ГП IIb/IIIa [34], что вызывает возрастание оптического сигнала светопропускания. В системе *Plateletworks* с помощью гемоанализатора производится подсчет количества тромбоцитов до и после агрегации на трубочки, покрытые АДФ или арахидоновой кислотой [35]. Основные достоинства этих методов – простота исполнения и отсутствие необходимости проведения дополнительных манипуляций с кровью. Оба метода используют для мониторинга антиагрегантной терапии [36, 37].

Работа анализатора PFA-100 (*Siemens*, Германия) основана на способности тромбоцитов к адгезии в условиях высоких скоростей сдвига и агрегации в присутствии агониста. Оценку функциональной активности тромбоцитов проводят в цельной крови с помощью симуляции первичного гемостаза на картриджах [38]. Кровь при высоких скоростях сдвига проходит через капилляр, имеющий на конце мембрану, покрытую коллагеном, на который нанесено микроскопическое отверстие, покрытое АДФ либо адреналином. В условиях высоких скоростей сдвига и присутствия агонистов происходит образование тромбоцитарного агрегата, закрывающего это отверстие. Время, за которое тромбоциты закупоривают отверстие и блокируют ток крови, называют временем закупоривания апертуры (*closure time*) – это показатель всего тромбоцитарного гемостаза. Использование анализатора позволяет определить, чем были вызваны нарушения функциональной активности тромбоцитов – внешними причинами (например, терапией аспирином) или дефектами самих тромбоцитов (например, синдром Бернара–Сулье или тромбастения Гланцмана) [39, 40].

Способность тромбоцитов к адгезии и агрегации оценивают также с помощью анализатора IMPACT (*DiaMed*, Швейцария) [41]. Тромбоциты адгезируют на полистероловой подложке в условиях высоких скоростей сдвига, которые обеспечиваются вращением конуса. Исследование полностью автоматизировано: анализатор проводит окрашивание, а также измеряет процент поверхности, покрытой тромбоцитарными агрегатами, как показатель способности тромбоцитов к адгезии, и средний размер агрегатов – показатель способности тромбоцитов к агрегации. Требуется дополнительные исследования для оценки роли анализатора в диагностике врожденных и приобретенных нарушений функций тромбоцитов.

Еще один метод лабораторной диагностики функции тромбоцитов, учитывающий влияние скорости сдвига, – проточные камеры [42]. Современные камеры изготовлены из полидиметилсилоксана (PDMS). В качестве субстратов в основном используют коллаген I или III типа, фактор Виллебранда, фибриноген,

тканевый фактор, фибронектин [43, 44]. Благодаря возможности контроля потока жидкости через камеру можно имитировать и изучать процесс роста тромба в условиях заданных скоростей сдвига [45]. Использование проточных камер позволяет также изучать пути Ca^{2+} сигнализации, активации интегринов и секреции тромбоцитов – этапов образования тромба [46, 47]. Тем не менее этот метод пока не включен в рутинную клиническую диагностическую практику, в основном из-за отсутствия стандартизации его использования и сборки камер [48]. Кроме того, для анализа в нескольких камерах требуется довольно большой объем крови – 5 мл и более [49].

Проточная цитометрия – метод анализа клеток и их компонентов с помощью антител, меченных флуоресцентным красителем [50]. Внутри проточного цитометра клетки в суспензии проходят через поток обжимающей жидкости, которая создает ламинарный поток, позволяя клеткам по отдельности проходить через источник света. От источника, обычно лазера, исходит луч монохромного света, он проходит через клетку. Антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями, могут связываться со специфическими белками на клеточной мембране или внутри клетки. Когда такая меченая клетка проходит через луч света, происходит возбуждение флуоресцентных молекул, в результате они переходят на более высокий энергетический уровень. При возврате на свой нормальный энергетический уровень флуорохромы испускают световую энергию. Использование нескольких флуорохромов, имеющих сходные длины волн возбуждения, но разные длины волн эмиссии, либо разные длины волн возбуждения (или «цветов»), позволяет одновременно измерять несколько характеристик клетки [51]. Свет, который клетка испускает в ответ, расходится во всех направлениях; оптическая система собирает его и направляет на различные фильтры и зеркала, которые изолируют лучи с определенной длиной волны. Световые сигналы регистрирует фотоумножитель и переводит их в цифровую форму для дальнейшего компьютерного анализа. Информация отображается обычно в виде гистограмм или двумерных дот-плотов.

С помощью проточной цитометрии измеряют оптические и флуоресцентные характеристики отдельных клеток, а также любых других частиц, например, ядер, микроорганизмов, хромосом. Физические характеристики, такие как размер и внутреннее строение, помогают разделить клетки на различные популяции.

Единственная группа заболеваний, при которых проточная цитометрия тромбоцитов является устойчивой и неотъемлемой частью структуры лабораторной диагностики, – это классические тромбоцито-

патии. Когда они однозначно связаны с отсутствием или недостатком тех или иных рецепторов (ГП Ib – для синдрома Бернара–Сулье; интегрин $\alpha IIb\beta 3$ – для тромбастении Гланцмана 1-го и 2-го типов и др.), цитометрия без всякой дополнительной стимуляции тромбоцитов (по факту – просто иммунофенотипирование) – высоконадежный тест как для скрининга, так и для постановки окончательного диагноза. В меньшей степени это утверждение справедливо для тех тромбоцитопатий, которые «заметны» только после активации тромбоцитов: синдром Скотта, тромбастения Гланцмана 3-го типа. Такая проточная цитометрия гораздо реже применяется в клинике, поскольку в данном случае выбор параметров (в первую очередь типа активации и маркеров) не обоснован ни фундаментальными данными по физиологии и патофизиологии, ни сколько-нибудь обширными клиническими испытаниями. Однако, учитывая высокую редкость четко определенных тромбоцитопатий, этот метод обладает нулевой коммерческой привлекательностью и не стандартизован нигде в мире. Фактически каждая лабораторно-клиническая команда (которых не так много) налаживает иммунофенотипирование тромбоцитов самостоятельно. Сегодня понятие «наследственная тромбоцитопатия» резко расширилось: сюда вошли разнообразные дефекты рецепторов и сигнализации, которые раньше не детектировались, но именно в этих случаях надо четко понимать, как активировать тромбоциты и какие ответы могут наблюдаться.

В области негенетических нарушений тромбоцитарной функции (от сепсиса и онкологии до недоношенных новорожденных и передозировки антиагрегантных препаратов) пока существуют только отдельные разработки, выполненные разными командами [52–54].

Метод определения функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) основан на сравнении данных проточной цитометрии покоящихся и активированных тромбоцитов. В качестве активатора используется смесь агонистов (пептид, активирующий рецептор тромбина (TRAP-6), пептид, родственник коллагену (CRP) и $CaCl_2$). Используемые панели антител позволяют получить информацию о количестве и активности ряда интегринов, участвующих в осуществлении основных функций тромбоцита. PAC-1, сцепленный с флуоресцентным красителем флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), связывается с активированной формой интегрин $\alpha IIb\beta 3$, рецептора фибриногена. CD42b, сцепленный с фикоэритрином (PE), связывается с ГП Ib, рецептором фактора Виллебранда. Аннексин V, меченный красителем Alexa647, – это маркер фосфатидилсерина, выходящего на поверхность тромбоцитов при их активации. CD61-PE связывается с ГП IIIa; CD62P-Alexa647 – с P-селектином, основным

веществом α -гранул. Мепакрин не является антителом, однако обладает собственной флуоресценцией и используется для оценки степени выброса плотных гранул [55]. Тест проводится в цельной крови, таким образом обеспечивая более физиологические условия и отсутствие этапа пробоподготовки. Кроме того, для его выполнения требуется небольшой объем крови (20 мкл), поэтому этот тест удобен для использования в педиатрии. Среди достоинств метода отметим также возможность использования его для анализа низких концентраций тромбоцитов (например, при ИТП), а среди недостатков – плохую стандартизацию.

Существуют исследования, в которых сообщают о наличии корреляции между возникновением кровотечений и результатами теста функциональной активности тромбоцитов пациентов [56, 57]. Метод используется для оценки изменений функциональной активности тромбоцитов в результате терапии ромиплостимом при ИТП [58], а также для оценки качества тромбоцитов в тромбоцитарных концентратах [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лабораторные методы оценки функции тромбоцитарного гемостаза претерпевают резкое изменение своего статуса. В связи с тем, что понимание гемостаза меняется с каждым годом, понятие «физиологическая функция тромбоцитов» стало более определенным и наполнено молекулярным смыслом. Можно надеяться, что в ближайшее время будут разработаны тесты, которые смогут давать полноценную информацию о способности тромбоцитов выполнять свои физиологические задачи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом фонда «Врачи, инновации, наука – детям» и грантами РФФИ 18-34-20026, 17-00-00140, 17-04-01309.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Ponomarenko E.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8697-7570>

Ignatova A.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5217-3937>

Fedorova D.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

Zharkov P.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4384-6754>

Panteleev M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

- Athale U.H., Chan A. Hemorrhagic complications in pediatric hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33 (4): 408–15.
- Yaguchi A., Lobo F.L., Vincent J.L., Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; 2 (12): 2096–102.
- Ramsey M.T., Fabian T.C., Shahan C.P., Sharpe J.P., Mabry S.E., Weinberg J.A., et al. A prospective study of platelet function in trauma patients. *J Trauma Acute Care Surgery* 2016; 80 (5): 726–33.
- Balashova E., Koltsova E., Ignatova A., Polokhov D., Kuprash A., Kirtbaya A., et al. Laboratory Parameters of Blood Coagulation and Platelet Functional Activity in Premature Neonates. *Am J Perinatol* 2016; 33: A015.
- Panteleev M.A., Dashkevich N.M., Ataullakhanov F. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015; 136 (4) 699–711.
- Rodvien R., Mielke C.H. Role of Platelets in Hemostasis and Thrombosis. *West J Med* 1976; 125 (3): 181–6.
- Yoo S.Y., Kwon S.M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediat Inflammation* 2013; 1.
- Thachil J. Platelets in Inflammatory Disorders: A Pathophysiological and Clinical Perspective. *Semin Thromb Hemost* 2015; 41 (6): 572–81.
- Walsh T.G., Metharom P., Berndt M. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. *Platelets* 2015; 26 (3): 199–11.
- Ruggeri Z. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 611–6.
- Ruggeri Z. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 2007; 120 (Suppl 1): S5–9.
- Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W., Schulte V., Bouvard D., Mokhtari-Nejad R., et al. Glycoprotein VI but not α 2 β 1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20 (9): 2120–30.
- Hou Y., Carrim N., Wang Y., Gallant R.C., Marshall A., Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res* 2015; 30: 29.
- Golino P., Crea F., Willerson J. How to study the effects of platelet aggregation and thrombosis on coronary vasomotion and their clinical relevance. *Ital Hear J* 2002; 3 (4): 220–5.
- Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kurasawa J.H., Sarafanov A.G., Chambost H., Vasil'ev S.A., et al. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1858 (6): 1216–27.
- Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N.,

- Obydenny S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., et al. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem* 2013; 288 (41): 29621–32.
17. Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Demina I.A., Ataullakhanov F.I., et al. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS One* 2015; 20 (1): e0116665.
 18. Clemetson K. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res Elsevier Ltd* 2012; 129 (3): 220–4.
 19. Brass L.F., Tomaiuolo M., Stalker T. Harnessing the platelet signaling network to produce an optimal hemostatic response. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013; 27 (3): 381–09.
 20. Varga-Szabo D., Pleines I., Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arter Thromb Vasc Biol* 2008; 28 (3): 403–12.
 21. Nurden A.T., Freson K., Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia* 2012; 18 (Suppl 4): 154–60.
 22. Luu S., Gardiner E.E., Andrews R. Bone Marrow Defects and Platelet Function: A Focus on MDS and CLL. *Cancers (Basel)* 2018; 10 (5): pii: E147.
 23. Winqvist M., Askid A., Andersson P.O., Karlsson K., Karlsson C., Lauri B., et al. Real-world results of ibrutinib in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: data from 95 consecutive patients treated in a compassionate use program. A study from the Swedish Chronic Lymphocytic Leukemia Group. *Haematologica* 2016; 101 (12): 1573–80.
 24. Bye A.P., Unsworth A.J., Vaiyapuri S., Stainer A.R., Fry M.J., Gibbins J. Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin α IIb β 3 Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen. *Arter Thromb Vasc Biol* 2015; 35 (11): 2326–35.
 25. Levade M., David E., Garcia C., Laurent P.A., Cadot S., Michallet A.S., et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood* 2024; 124 (26): 3991–5.
 26. Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927–9.
 27. Gadisseur A., Hermans C., Berne-man Z., Schroyens W., Deckmyn H., Michiels J. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematol* 2009; 121 (2–3): 71–84.
 28. Jennings L.K., McCabe White M. Platelet aggregation. *Platelets/ed. Michelson*. Boston: Academic Press, 2007, 495–507.
 29. Филиппова О.И., Колосков А.В., Столица А.А. Методы исследования функциональной активности тромбоцитов (обзор литературы). *Трансфузиология* 2012; 13: 493–514.
 30. Chan M.V., Armstrong P.C.J., Papalia F., Kirkby N.S., Warner T. Optical multi-channel (optimul) platelet aggregometry in 96-well plates as an additional method of platelet reactivity testing. *Platelets* 2011; 22 (7): 485–94.
 31. Armstrong P.C., Leadbeater P.D., Chan M.V., Kirkby N.S., Jakubowski J.A., Mitchell J.A., et al. In the presence of strong P2Y₁₂ receptor blockade, aspirin provides little additional inhibition of platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (3): 552–61.
 32. Cattaneo M., Hayward C.P., Moffat K.A., Pugliano M.T., Liu Y., Michelson A. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (6): 1029.
 33. Cardinal D.C., Flower R. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3 (2): 135–58.
 34. Smith J.W., Steinhubl S.R., Lincoff A.M., Coleman J.C., Lee T.T., Hillman R.S., et al. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999; 99 (5): 620–5.
 35. Campbell J., Ridgway H., Carville D. Plateletworks: a novel point of care platelet function screen. *Mol Diagn Ther* 2008; 12 (4): 253–8.
 36. Lennon M.J., Gibbs N.M., Weightman W.M., McGuire D., Michalopoulos N. A comparison of Plateletworks and platelet aggregometry for the assessment of aspirin-related platelet dysfunction in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004; 18 (2): 136–40.
 37. Craft R.M., Chavez J.J., Snider C.C., Muenchen R.A., Carroll R. Comparison of modified Thrombelastograph and Plateletworks whole blood assays to optical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrel inhibition in elective surgery patients. *J Lab Clin Med* 2005; 145 (6): 309–15.
 38. Favaloro E.J., Mohammed S. Platelet function testing: auditing local practice and broader implications. *Clin Lab Sci* 2010; 23 (1): 21–31.
 39. Hayward C.P., Harrison P., Cattaneo M., Ortel T.L., Rao A.K. Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (2): 312–9.
 40. Homoncik M., Jilma B., Hergovich N., Stohlawetz P., Panzer S., Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost* 2000; 83 (2): 316–21.
 41. Varon D., Dardik R., Shenkman B., Kotev-Emeth S., Farzame N., Tamarin I., et al. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb Res* 1997; 85 (4): 283–94.
 42. Sakariassen K.S., Hanson S.R., Cadroy Y. Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent antithrombotic efficacy. *Thromb Res* 2001; 104 (3): 149–74.
 43. Heemskerk J.W., Sakariassen K.S., Zwaginga J.J., Brass L.F., Jackson S.P., Farndale R.W., et al. Collagen surfaces to measure thrombus formation under flow: possibilities for standardization. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (4): 856–8.
 44. Cosemans J.M., Kuijpers M.J., Lecut C., Loubele S.T., Heeneman S., Jandrot-Perrus M., et al. Contribution of platelet

- glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2005; 181 (1): 19–27.
45. Jackson S.P., Nesbitt W.S., Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 17–20.
46. Cosemans J.M., Iserbyt B.F., Deckmyn H., Heemskerk J. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (8): 1253–61.
47. Jackson S. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109 (12): 5087–95.
48. Roest M., Reininger A., Zwaginga J.J., King M.R., Heemskerk J.W. Biorheology Subcommittee of the SSC of the ICTH. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (11): 2322–4.
49. Van Kruchten R., Cosemans J.M., Heemskerk J. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers – a practical guide. *Platelets* 2012; 23 (3): 229–42.
50. Сироткина О.В., Боганькова Н.А., Ласковец А.Б., Кухарчик Г.А., Гайковая Л.Б., Вавилова Т.В. Иммунологические методы в оценке функциональной активности тромбоцитов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Медицинская иммунология* 2010; 12 (3): 213–8.
51. Brown M., Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000; 46 (8, pt. 2): 1221–9.
52. Södergren A.L., Ramström S. Platelet subpopulations remain despite strong dual agonist stimulation and can be characterised using a novel six-colour flow cytometry protocol. *Sci Rep* 2018; 8 (1): 1441.
53. Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Frelinger A.L. 3rd F.M. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 2000; 21 (3): 259–70.
54. Rochat S., Alberio L. Formaldehyde-fixation of platelets for flow cytometric measurement of phosphatidylserine exposure is feasible. *Cytom A* 2015; 87 (1): 32–6.
55. Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Polokhov D.M., Suntsova E.V., Zharkov P.A., Fedorova D.V., et al. Flow cytometry for pediatric platelets. *Platelets* 2018; 4: 1–10.
56. Федорова Д.В., Жарков П.А., Игнатова А.А., Федотов А.Ю., Полохов Д.М., Полетаев А.В. и соавт. Диагностика тромбоцитопатий у детей: корреляции исследования функциональной активности тромбоцитов с клинической картиной и результатами агрегометрии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 17 (1): 16–22.
57. Жарков П.А., Демина И.А., Пантелев М.А. Использование метода функциональной активности тромбоцитов для диагностики тромбоцитопатий у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2016; 15 (2): 40–6.
58. Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., et al. Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2017; 105 (6): 841–8.
59. Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E., Rumiantsev S.A., Panteliev M.A. Functional characteristics and clinical effectiveness of platelet concentrates treated with riboflavin and ultraviolet light in plasma and in platelet additive solution. *Vox Sang* 2016; 110 (3): 244–52.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 13.05.2019

Принята к печати 10.06.2019

Обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция: механизмы и потенциальная значимость

А.А. Филькова^{1,2}, М.А. Пантелеев^{1,2,3,4}, А.Н. Свешникова^{1,2,3,5}¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва² ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва⁴ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва⁵ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

Контактная информация:
Пантелеев Михаил Александрович,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. лабораторией клеточного
гемостаза и тромбоза НМИЦ
детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Нарушения функционирования тромбоцитов – клеток крови, ответственных за образование тромбов и остановку кровотечения, – наблюдаются как самостоятельные заболевания, как осложнение онкологических и гематологических заболеваний или как следствие терапии. Тестирование агрегации тромбоцитов методом агрегометрии – практически единственный диагностический инструмент оценки функциональности тромбоцитов. Существует несколько разновидностей агрегометрии, которые различаются по методу регистрации образования тромбоцитарных агрегатов, а также способу подготовки тромбоцитов для эксперимента. В большинстве лабораторий принято проводить агрегометрию в богатой тромбоцитами плазме в присутствии ионов цитрата. В этом случае снижается концентрация ионов кальция в плазме, что предотвращает образование тромбина и свертывание плазмы крови. С другой стороны, известно, что агрегация тромбоцитов в ответ на АДФ в присутствии ионов кальция (в плазме крови, взятой на гепарин или гирудин, также блокирующие свертывание плазмы) обратима: через 1–5 мин после добавления активатора начинается распад агрегатов вплоть до полного возвращения светопропускания раствора (концентрации тромбоцитов) на исходный уровень. Этот феномен называют «обратимой» агрегацией тромбоцитов (деагрегацией); в некоторых случаях она наблюдается и в агрегометрии в цитратной плазме, особенно у педиатрических пациентов, однако обычно деагрегация не считается нормой и рассматривается как признак дисфункции тромбоцитов. В настоящем обзоре рассмотрены известные механизмы деагрегации тромбоцитарных агрегатов в присутствии и отсутствии кальция в среде. Обсуждается роль вторичной активации тромбоцитов как потенциальной причины необратимой агрегации, а также возможные варианты интерпретации результатов агрегометрии, в которой наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов.

Ключевые слова: агрегометрия, обратимая агрегация, тромбоциты, кальций, вторичная активация тромбоцитов, аспирин, АДФ, серотонин, адреналин

Филькова А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 120–129.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-120-129

© 2019 by NMRC PHOI

Received 13.05.2019

Accepted 10.06.2019

Reversible platelet aggregation in the presence of calcium ions: mechanisms and potential value

A.A. Filkova^{1,2}, M.A. Panteleev^{1,2,3,4}, A.N. Sveshnikova^{1,2,3,5}¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow² Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow³ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology,

Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow⁵ Sechenovskiy University, Moscow

Correspondence:
Mikhail A. Panteleev, PhD, DSc,
Head of the Laboratory of cellular
hemostasis and thrombosis
of Dmitry Rogachev National
Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology,
Immunology Ministry of Healthcare
of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow,
Samory Mashela st., 1
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Disorders in the functions of platelets – blood cells responsible for the blood clots formation and prevention – are observed as independent diseases, as a complication of cancer and hematological diseases or as a result of a therapy. Nowadays, a test of platelet aggregation by aggregometry is the only diagnostic method for assessing the platelets functions. There are several varieties of aggregometry, which differ both in the method of recording the formation of platelet aggregates and in the method of preparing platelets for the experiment. In most laboratories, it is customary to conduct aggregometry in platelet-rich plasma in the presence of citrate ions. In this case, the concentration of calcium ions in plasma decreases, it prevents the thrombin formation and the plasma coagulation. On the other hand, it has long been known that platelet aggregation in response to ADP in the presence of calcium ions (in blood plasma collected in heparin or hirudin tubes, also blocking plasma clotting) is reversible: after 1–5 minutes after the addition of the activator, the disaggregation begins until the light transmission of the solution (platelet concentration) returns to its original level. This phenomenon is called "reversible" platelet aggregation. Reversible aggregation ("disaggregation") is sometimes observed in aggregometry of citrate plasma, especially in pediatric patients. However, it is usually not considered normal and is considered a sign of platelet dysfunction. This review considers the known mechanisms of disaggregation in the presence or absence of calcium ions in the medium. The role of secondary activation of platelets as a potential cause of irreversible aggregation is discussed, as well as possible versions for explaining the results of aggregometry, when reversible platelet aggregation is observed.

Key words: aggregometry, reversible aggregation, platelets, calcium, secondary activation of platelets, aspirin, ADP, serotonin, adrenaline

Filkova A.A., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (3): 120–129.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-120-129

Для поддержания нормального гемостаза (остановки кровотечения в случае повреждения сосуда) необходимы специализированные клетки крови – тромбоциты. Эти клетки способны адгезировать к поврежденным тканям и агрегировать друг с другом, образуя гемостатическую пробку, перекрывающую повреждение. Способность тромбоцитов к адгезии и агрегации определяется их специфическими мембранными гликопротеинами, в первую очередь интегрином $\alpha\text{IIb}\beta_3$, активирующимся при контакте тромбоцита с местом повреждения или при появлении растворимых активаторов. Среди активаторов тромбоцитов широко известны такие агонисты, как АДФ, тромбоксан А2, коллаген, тромбин. Они отличаются по механизму действия на тромбоцит и степени его активации, поэтому для качественной оценки функциональности тромбоцитов в клинической практике исследуют ответ тромбоцитов пациента на различные индукторы агрегации [1].

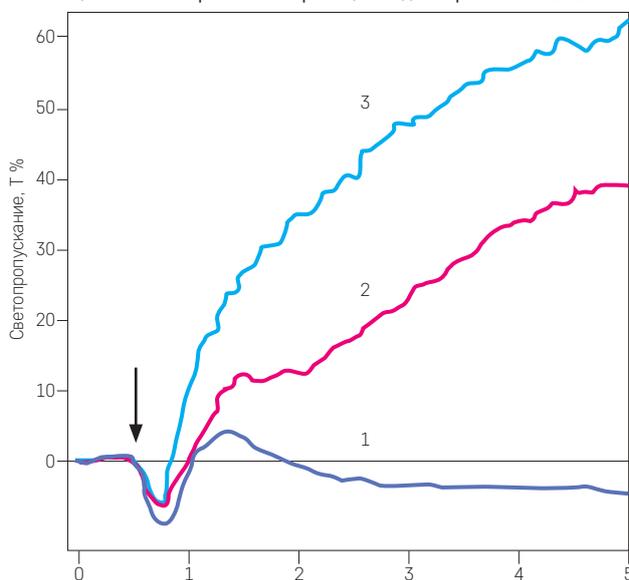
Наиболее распространенный в клинической практике тест активности тромбоцитов – агрегометрия [1]. Этот тест заключается в регистрации изменения прозрачности суспензии тромбоцитов после добавления в нее активатора, вызывающего «слипание» тромбоцитов – их агрегацию, и следовательно, увеличение светопропускания суспензии (рисунок 1). Чем быстрее образуются агрегаты, тем успешнее активировались тромбоциты. В большинстве лабораторий тест агрегометрии ставится в богатой тромбоцитами плазме, полученной из цельной крови, взятой на цитрат. При этом в среде значительно снижена концентрация свободных ионов кальция, что исключает влияние плазменного звена свертывания крови на работу тромбоцитов. Типичные агрегационные кривые цитратной плазмы имеют необратимый характер, часто – с характерным перегибом, обозначающим момент второй волны активации тромбоцитов (рисунок 1).

Однако в физиологических условиях агрегация тромбоцитов происходит в присутствии 1–2 мМ свободных ионов кальция (концентрация в плазме крови). Чтобы сохранить плазменную концентрацию кальция, но не инициировать свертывание плазмы крови при ее взятии, необходимо использовать другой антикоагулянт, например, гепарин, активирующий анти-тромбин III, который ингибирует основные ферменты свертывания. Альтернатива гепарину, в некоторых случаях способному активировать тромбоциты [3], – гирудин, прямой ингибитор тромбина. Альтернативой гепариновой (гирудиновой) плазме является постановка агрегометрии в суспензии отмытых тромбоцитов с добавлением в раствор фибриногена, при этом ионный состав раствора можно легко контролировать [4]. Интересно, что ответ тромбоцитов в присутствии ионов кальция слабее: на слабые индукторы (АДФ,

серотонин в комбинации с адреналином) наблюдается обратимая агрегация, как на низкие концентрации АДФ (рисунок 1, кривая 1).

Рисунок 1

Характерный агрегационный ответ на активацию АДФ богатой тромбоцитами плазмы, взятой на цитрат: 1 – обратимая агрегация на низкие концентрации АДФ; 2 – появление второй волны активации; 3 – необратимая агрегация (адаптировано из [2])



В настоящем обзоре рассмотрены известные механизмы дезагрегации тромбоцитарных агрегатов в присутствии и отсутствие кальция в среде. Обсуждается роль вторичной активации тромбоцитов как потенциальной причины необратимой агрегации, а также возможные варианты интерпретации результатов агрегометрии, в которой наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов.

Молекулярные механизмы агрегации тромбоцитов. Начальный элемент в запуске тромбообразования – адгезия неактивированного тромбоцита к коллагену межклеточного матрикса, сначала через фактор Виллебранда, это становится возможным после повреждения стенок сосуда. Это высокомолекулярные белки, способные многоточечно связываться со своими рецепторами на поверхности тромбоцита. Во всех процессах адгезии и агрегации тромбоцитов задействованы трансмембранные гетеродимерные рецепторы – интегрины, состоящие из двух цепей (α и β) и способные к кластеризации. За адгезию (прикрепление) тромбоцита к коллагену отвечает рецептор $\alpha_2\beta_1$. Предполагается, что тромбоциты адгезируют к коллагену за счет данного рецептора, а затем активируются при дополнительном связывании коллагена с рецептором гликопротеином VI (GPVI). После активации тромбоцита в нем происходит синтез и секреция дополнительных активаторов (АДФ, тромбоксан А2 и др.), которые могут активировать соседние тромбоциты. Внешне активация

тромбоцита выражается в изменении его формы за счет перестройки актинового цитоскелета.

Одно из важнейших следствий активации тромбоцита – переход специфичных для тромбоцита интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ (гликопротеин IIb/IIIa) на мембране в активированное состояние. В этом состоянии рецептор способен связать полипептидную цепь белка фибриногена, через который идет связь двух активированных тромбоцитов, образуя «мостик». Связываясь друг с другом таким образом, тромбоциты способны агрегировать и образовывать устойчивый тромб.

Интересно, что образующийся в ответ на слабые активаторы (АДФ, серотонин) агрегат неустойчив и способен самопроизвольно разваливаться на одиночные тромбоциты или агрегаты меньших размеров [5]. Примечательно, что данный эффект наблюдается только при наличии кальция в среде [4]. Этот феномен был обнаружен в тесте агрегометрии.

Диагностика функциональности тромбоцитов методом агрегометрии. Тест на агрегацию тромбоцитов – широко распространенный и доступный способ оценки функциональности тромбоцитов, но при этом очень важно умение точно трактовать полученные в тесте результаты. Существует несколько разновидностей агрегометрии, которые отличаются по методу регистрации образования тромбоцитарных агрегатов, а также способу подготовки тромбоцитов для эксперимента. Наиболее распространенным методом регистрации агрегации остается турбидиметрический (от англ. *turbidity* – мутность) метод Борна и О'Брайена, основанный на изменении светопропускания [1]. В агрегометре луч света проходит через кювету с исследуемым образцом (суспензией тромбоцитов) и попадает на регистрирующий фотоэлемент. В начальный момент времени суспензия тромбоцитов, которая с постоянной

скоростью перемешивается магнитной мешалкой, содержит одиночные тромбоциты в концентрации от 150 до 400 тыс./мкл. При данных условиях луч света рассеивается; интенсивность света, доходящего до датчика, принимают за нулевой уровень (рисунок 2).

При добавлении к тромбоцитам активатора (в стандартном тесте агрегометрии это АДФ, тромбин, арахидоновая кислота, коллаген, ТХА2) происходит образование агрегатов из одиночных тромбоцитов; светопропускающая способность суспензии при этом растет, так как количество светорассеивающих центров уменьшается. За максимальный (100%-й) уровень агрегации тромбоцитов принимают светопропускающую способность раствора без тромбоцитов. Перед выполнением теста необходимо производить калибровку прибора. Для измерения агрегации в богатой тромбоцитами плазме контролем является бедная тромбоцитами плазма; для отмытых тромбоцитов – буферный раствор, в котором они ресуспендированы. Для количественного описания агрегации оценивают такие параметры, как максимальный уровень светопропускания и максимальная скорость агрегации (изменение уровня светопропускания за период времени).

С помощью турбидиметрического метода можно также наблюдать изменение формы тромбоцитов по некоторому снижению уровня светопропускания непосредственно после добавления агониста. Этот эффект хорошо различим для отмытых тромбоцитов при активации АДФ в отсутствие фибриногена (рисунок 3). Изменение формы при активации наблюдается в ответ на все агонисты, кроме адреналина [6].

Для регистрации слабых ответов на малые концентрации агонистов или спонтанной активации применяется метод флуктуаций светопропускания (ФСП метод) [7]. Относительная дисперсия ФСП

Рисунок 2

Схема исследования агрегации тромбоцитов на оптическом агрегометре по методу Борна и О'Брайена [1]

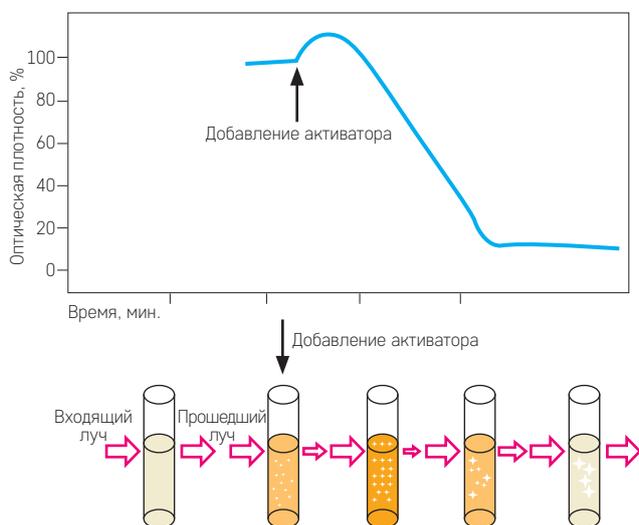
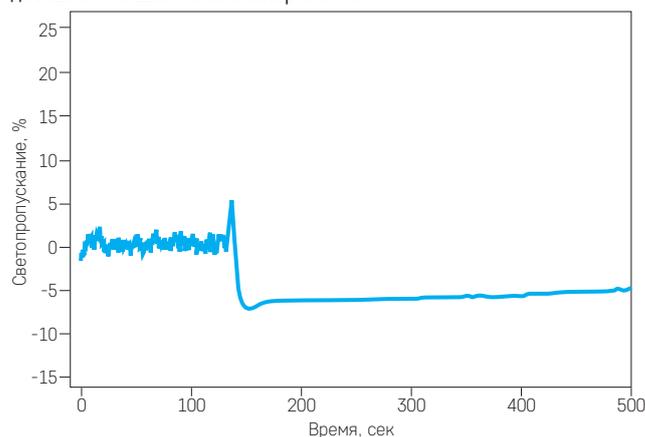


Рисунок 3

Изменение формы отмытых тромбоцитов в ответ на 5 мкМ АДФ в отсутствие фибриногена (собственные данные). Типичный результат для здорового донора. Отмывание тромбоцитов от белков плазмы проводилось тройным центрифугированием по методу, описанному ранее (26). Тромбоциты ресуспендированы в буфере Тирода (26) до концентрации 200 тыс./мкл; активатор добавлен на 120-й сек эксперимента



пропорциональна среднему количеству тромбоцитов в агрегате. Данный метод, в отличие от турбидиметрического анализа, чувствителен к маленьким агрегатам, состоящим из нескольких тромбоцитов (рисунки 4).

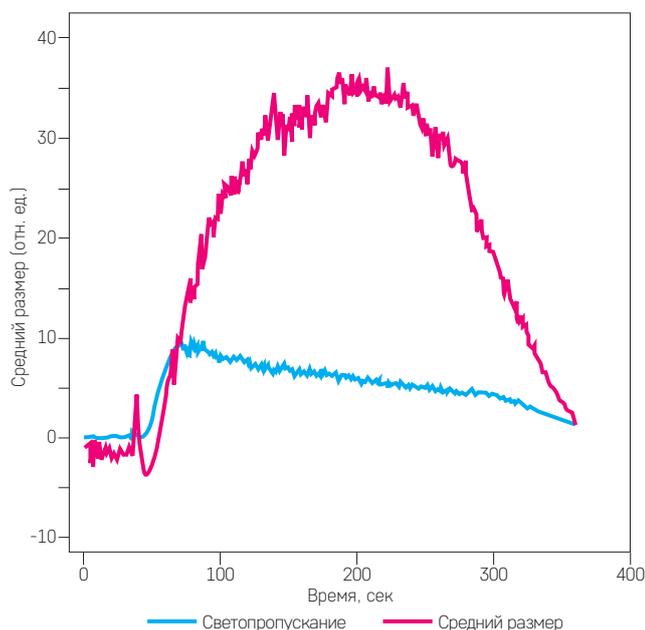
Используют также импедансный метод, основанный на изменении сопротивления суспензии тромбоцитов при пропускании через нее электрического тока. При опускании в цельную кровь электродов и активации тромбоцитов они «налипают» на поверхность электрода, что имитирует гемостатический сгусток на поверхности сосудистого повреждения. Данный метод считается наиболее приближенным к физиологическим условиям [8]. Однако, так как механизмы адгезии тромбоцитов к электродам отличаются от механизмов адгезии тромбоцитов друг к другу, обратимая агрегация в импедансном методе наблюдается крайне редко, поэтому мы не будем рассматривать здесь этот метод.

Ответы на различные индукторы агрегации в агрегометрии. В тесте агрегации для оценки функциональности тромбоцитов одного донора используют сразу несколько агонистов с целью получения полной картины тромбоцитарного ответа. В стандартный набор агонистов для теста входят АДФ, тромбин, адреналин, серотонин, коллаген, ТХА2, арахидоновая кислота. Каждый из перечисленных агонистов имеет специализированные рецепторы на мембране тромбоцита.

АДФ – один из основных физиологических индукторов активации – содержится в плотных грану-

Рисунок 4

Оценка агрегации тромбоцитов турбидиметрическим (красная кривая) и методом оценки размера (ФСР, см. текст, синяя кривая) (собственные данные). Условия эксперимента аналогичны описанным в подписи к рисунку 3. Буфер Тирода дополнен 200 мкг/мл человеческого фибриногена; активатор (5 мкМ АДФ) добавлен на 35-й сек эксперимента



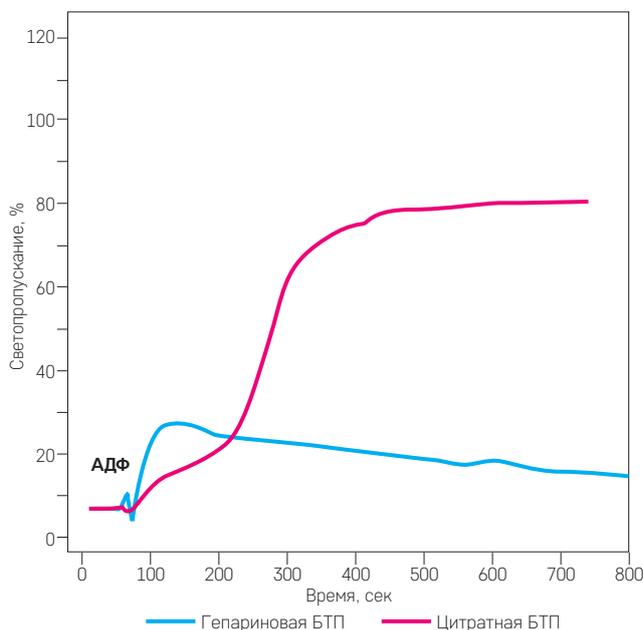
лах, а также выходит из поврежденных эритроцитов и других клеток. Он связывается с пуриnergическими рецепторами на тромбоците – $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ и $P2X_1$, при этом $P2X_1$ мгновенно десенситизируется (считается, что в тесте агрегометрии он не работает). Специфичным для тромбоцита является ассоциированный с G_i -белком рецептор $P2Y_{12}$; связывание его с АДФ приводит к снижению концентрации АМФ в тромбоците, тем самым усиливая ответ и стабилизируя агрегаты. Одиночная активация данного рецептора приводит к слабой активации гликопротеина (ГП) IIb/IIIa; изменения формы тромбоцитов в ответ на этот рецептор не происходит [9]. $P2Y_{12}$ -индуцированная активация также запускает фосфоинозитидную сигнализацию, что ведет к частичной агрегации тромбоцитов у трансгенных $P2Y_1$ -/- мышей.

$P2Y_1$ – рецептор, ассоциированный с G_q -белком; его активация приводит к запуску кальциевой сигнализации в тромбоците, изменению формы, активации интегринов и частичному выбросу гранул. Эксперименты на трансгенных мышах с увеличенной на 83% концентрацией рецептора $P2Y_1$ на мембране тромбоцита показали, что при увеличении рецепторов данного типа в ответ на АДФ наблюдается секреция гранул [10]. Это означает, что недостаточная концентрация $P2Y_1$ может объяснять слабый ответ тромбоцитов на АДФ.

Известно, что через некоторое время после активации тромбоцитов АДФ они становятся рефрактерными, что увеличивает риск кровоточивости

Рисунок 5

Агрегация тромбоцитов в ответ на 5 мкМ АДФ (собственные данные). Богатая тромбоцитами плазма (БТП) получена из цельной крови здоровых доноров путем центрифугирования [26]. Концентрация тромбоцитов доведена до 200 тыс./мкл свободной от тромбоцитов плазмой из того же образца крови; активатор добавлен на 50-й сек эксперимента



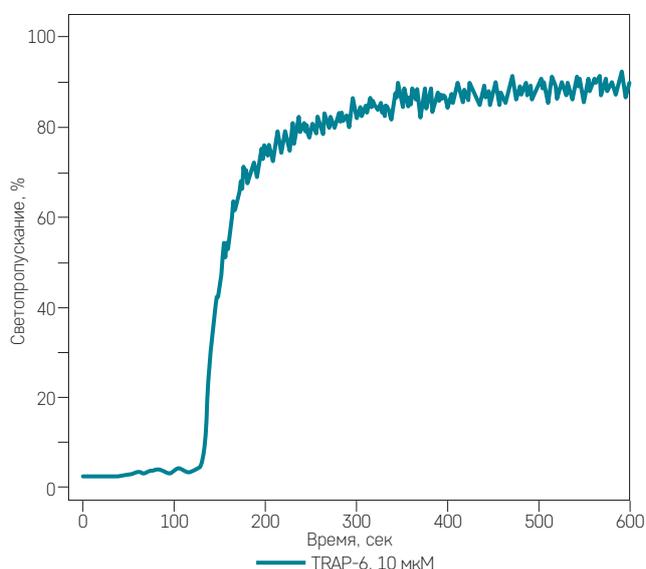
после операций. Этот эффект связывают с десенситизацией рецептора P2Y₁ после его активации. Интересно, что P2Y₁₂ при тех же условиях остается функциональным [11]. Выявлено, что оба рецептора после активации уходят внутрь тромбоцита, однако с разным характерным временем и с помощью разных механизмов. В результате часть рецепторов P2Y₁₂ остается на мембране, что обуславливает его функциональность [12]. Оба типа рецептора играют важную роль в агрегации тромбоцитов [9].

АДФ – слабый активатор, в частности, для индуцирования агрегации АДФ необходимо наличие экзогенного фибриногена. В плазме, взятой на цитрат, наблюдается необратимая двухволновая агрегация, перед которой хорошо различимо изменение формы тромбоцита [13]. В суспензии тромбоцитов в присутствии в среде ионов кальция в ответ на АДФ наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов (рисунк 5).

Тромбин – не только ключевой фактор плазменного каскада свертывания, он способен активировать тромбоциты через специальные рецепторы на поверхности: PAR-1 (*protease activated receptors* – рецепторы, активируемые протеазами), PAR-4, ГП Ib-V-IX. PAR-4 вносит ощутимый вклад в активацию тромбоцитов в условиях ингибирования и десенситизации PAR-1 – главного высокоаффинного рецептора [14]. Для эффективной агрегации в ответ на тромбин не требуется наличия экзогенного фибриногена, так как при сильной активации тромбоциты секретируют значительное количество эндогенного белка.

Рисунок 6

Агрегация тромбоцитов в цитратной БТП в ответ на 10 мкМ TRAP-6 (собственные данные). Экспериментальная постановка аналогична описанной в подписи к рисунку 5; активатор добавлен на 125-й сек эксперимента



Тромбин – сильный активатор, вызывающий необратимую агрегацию с секрецией гранул (рисунк 6).

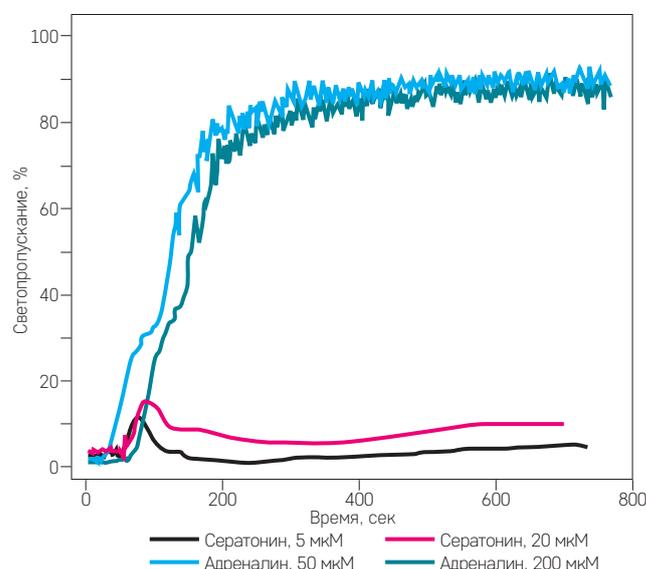
Тромбин используется для активации только отмытых тромбоцитов, так как в богатой тромбоцитами плазме (БТП) присутствует фибриноген – основная мишень тромбина в плазменном свертывании. При необходимости проведения теста в БТП либо при селективной активации рецепторов тромбина используют TRAP (*thrombin receptor activating peptides* – пептиды, активирующие рецептор тромбина).

Адреналин относится к слабым индукторам агрегации. Он действует на альфа-2 адренорецептор, ассоциированный с G_z-белком, предположительно вызывая ингибирование аденилат-циклазы. В цитратной БТП адреналин вызывает необратимую агрегацию [15], однако в БТП с физиологической концентрацией кальция агрегации не наблюдается. При этом в суспензии отмытых тромбоцитов ответ вариабельный. Адреналин напрямую не изменяет вязкость внешней мембраны, не влияет на уровень внутриклеточного кальция, связывание фибриногена или фосфорилирование белков [15]. Однако при добавлении адреналина совместно с другим активатором данные процессы усиливаются. Таким образом, адреналин чаще используют как модулирующий агент, а не самостоятельный активатор.

Серотонин находится в плотных гранулах тромбоцитов и высвобождается из них после активации сильными агонистами. Он специфичен к 5HT_{2A}-рецепторам и является слабым агонистом, который поддерживает ответ остальных индукторов агрегации.

Рисунок 7

Агрегация тромбоцитов в цитратной БТП в ответ на 5–20 мкМ серотонина либо 5–20 нг/мл адреналина (собственные данные). Экспериментальная постановка аналогична описанной в подписи к рисунку 5; активаторы добавлены до 20-й сек эксперимента



ции. Самостоятельно способен вызывать обратимую агрегацию (рисунк 7) [16, 17].

Коллагены всех типов локализованы в разных слоях сосудистой стенки. Рецепторами служат ГП VI и ГП Ib/IIa. Коллагены I и III типов – сильные активаторы, они стимулируют секрецию гранул и синтез ТХА2. Для эффективной агрегации в ответ на коллаген не требуется наличия экзогенного фибриногена [18, 19].

Синтез ТХА2 запускается при кальций-зависимой активации фосфолипазы А2. Его рецептором является TP-рецептор (*Thromboxane Prostanoid* – тромбоксановый простаноидный). В связи с тем что ТХА2 – нестабильное короткоживущее соединение, в экспериментах используют его стабильный аналог – U46619 либо арахидоновую кислоту, которая в тромбоците превращается в ТХА2 под действием циклооксигеназы. Данные агонисты считаются сильными и способны вызывать необратимую агрегацию в отсутствие экзогенного фибриногена [20, 21]. Многообразие путей активации обеспечивает большой запас прочности для реакции активации и последующей агрегации тромбоцитов. Для полноценной оценки функциональности клетки в тесте агрегометрии необходимо видеть всю картину ответов тромбоцита. Важную роль приведенных выше активаторов подтверждают эксперименты по агрегометрии в присутствии ингибиторов рецепторов тромбоцита к ним.

У пациентов, принимающих антагонисты P2Y₁, P2Y₁₂, ацетилсалициловую кислоту, регистрируют

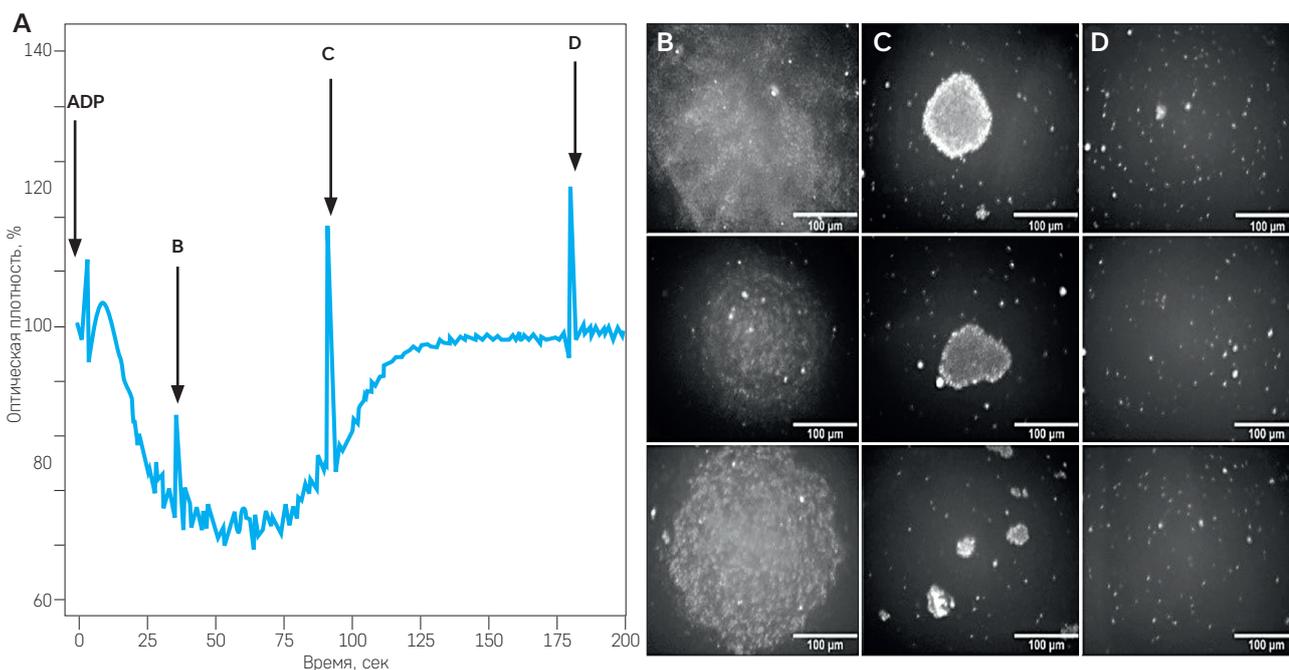
подавление агрегации, изменение необратимой агрегации на обратимую. Эффект ослабления агрегационной способности используется при назначении пациентам комплексного приема лекарств [22, 23]. При этом антагонисты рецептора ГП IIb/IIIa полностью подавляют агрегацию тромбоцитов.

Вариации агрегометрии. В большинстве лабораторий агрегометрию смотрят на богатой тромбоцитами плазме, взятой на цитрат. Однако в такой постановке, во-первых, присутствуют белки плазменного звена свертывания крови, которые могут повлиять на активацию тромбоцитов, во-вторых, снижена концентрация ионов кальция, необходимых для нормального связывания фибриногена с интегринами.

Чтобы исключить влияние составляющих плазмы, тромбоциты отмывают от белков плазмы. Наиболее распространены два подхода к отмыванию тромбоцитов: гель-фильтрация и серия последовательных центрифугирований. В первом случае используют метод хроматографии на колонке с сефарозой 2В [24]. Это позволяет полностью очистить тромбоциты от белков плазмы, ассоциированных с ними (фактор Виллебранда, фибриноген, факторы свертывания плазмы и др.), однако практически всегда приводит к небольшой активации тромбоцитов. При втором подходе богатая тромбоцитами плазма центрифугируется при пониженном значении pH (6,5), после этого осадок ресуспендируется в буферном растворе, содержащем ингибиторы активации тромбоцитов (простациклин, апираза и др.), – этот процесс про-

Рисунок 8

Характерный вид агрегатов тромбоцитов в кювете агрегометра [26, адаптировано]: агрегация гирудиновой БТП инициировалась 2 мкМ АДФ в начальный момент времени (А); в моменты времени В–D из кюветы забирали 5 мкл суспензии для непосредственного анализа на темнопольном микроскопе (В–D); в точке В обычно наблюдались большие агрегаты (диаметром > 100 мкм); в точке С – средние (диаметром 20–100 мкм); после полной деагрегации (D) наблюдались отдельные тромбоциты и маленькие агрегаты (диаметром < 10 мкм)



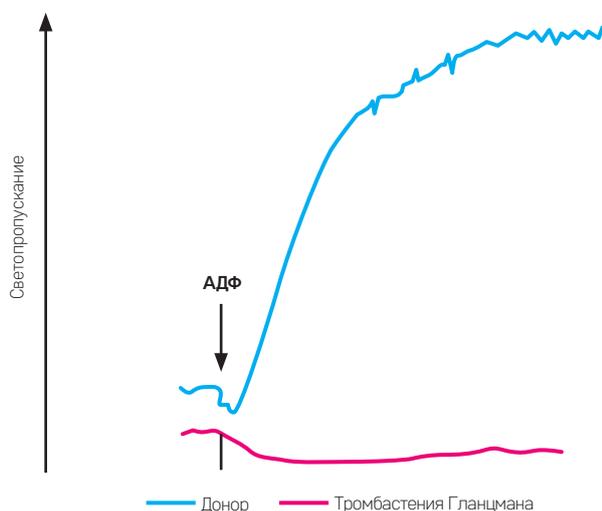
исходит 1–2 раза [4]. Однако при отмывании тромбоцитов даже самым щадящим методом их ответ на агрегацию все равно существенно ниже, чем ответ БТП на те же концентрации агониста. По-видимому, процесс отмывания тромбоцитов вне зависимости от используемого протокола влияет на активацию тромбоцитов [4].

Независимо от протокола работы в ответ на АДФ в присутствии ионов кальция в среде наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов. При наблюдении суспензии тромбоцитов под микроскопом было подтверждено, что снижение светопропускания соответствует дезагрегации тромбоцитов (рисунк 8). Обратимая агрегометрия наблюдается в ответ на такие слабые активаторы, как серотонин, АДФ, либо на комплекс адреналин + серотонин в присутствии кальция. Считается, что при обратимой агрегации не происходит второй волны активации тромбоцитов, то есть не идет секреция гранул со вторичными активаторами и/или не происходит синтеза тромбосана. Роль секреции гранул показана в эксперименте с обратимой агрегацией в ответ на тромбин при ингибировании АДФ [25].

На данный момент существует несколько гипотез молекулярного механизма обратимой агрегации [26]. Согласно одной из них, в отсутствие ионов кальция синтезируется тромбосан А2, который дополнительно активирует тромбоциты и поддерживает рецепторы ГП IIb/IIIa в активированном состоянии, что не дает агрегату развалиться. При наличии кальция в среде синтез тромбосана А2 частично ингибируется, рецепторы не поддерживаются в активированном состоянии, сгусток разваливается на отдельные тромбоциты [27]. Другая теория основана на том, что у ГП IIb/IIIa существует промежуточная конформация,

Рисунок 9

Отсутствие агрегационного ответа на АДФ у пациента с тромбастенией Гланцмана (ТГ) по сравнению со здоровым донором [2]



с которой фибриноген может связываться обратимо. За счет этого при высоких скоростях перемешивания суспензии тромбоцитов связи в агрегатах недостаточно сильны, и агрегат разваливается на одиночные тромбоциты. Третья теория: АДФ перестает поддерживать тромбоциты в активированном состоянии, так как происходит десенситизация рецептора P2Y₁ и частично P2Y₁₂ [12].

Типичные результаты агрегометрии, наблюдаемые при тромбоцитопатиях

Тромбастения Гланцмана – это врожденный дефицит или дисфункция гликопротеина IIb/IIIa, аутомно-рецессивное заболевание, которое сопровождается кровотечениями кожи и слизистых оболочек. Агрегационный ответ наблюдается только при добавлении высоких доз ристоцетина (рисунки 9, 10) [28], что подтверждает ключевую роль ГП IIb/IIIa в агрегации тромбоцитов.

Синдром Бернара–Сулье – врожденный дефицит или дефект комплекса гликопротеинов Ib/IX/V тромбоцитов; наследуется как аутомно-рецессивный признак с тяжелыми кровотечениями. Агрегация тромбоцитов в норме при индукции АДФ, коллагена, адреналина и арахидоновой кислоты, но отсутствует после добавления ристоцетина (рисунк 10) [28].

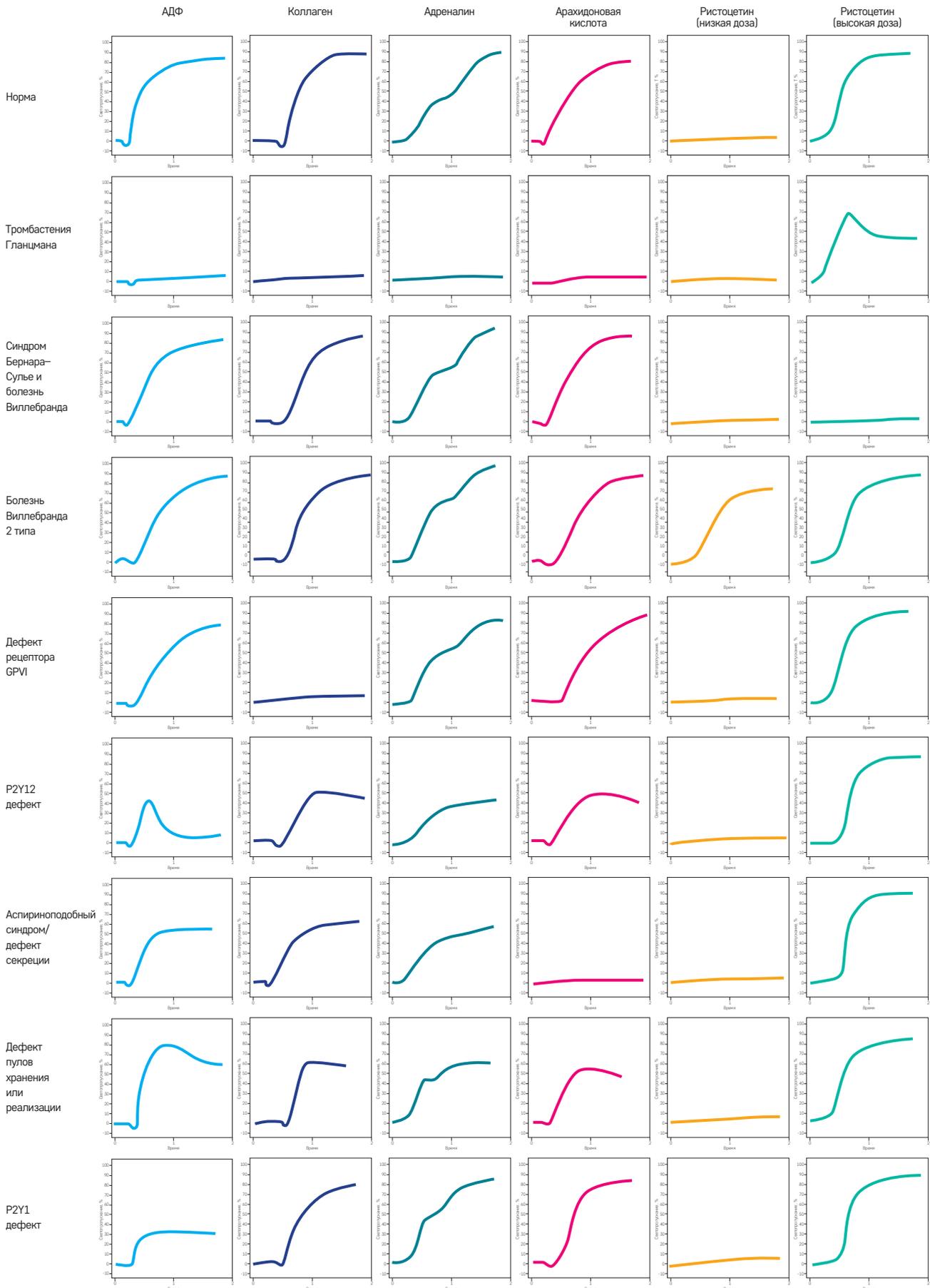
Болезнь Виллебранда характеризуется генетическими мутациями, приводящими к количественным и/или качественным изменениям фактора Виллебранда и угнетению реакций тромбоцитов, зависящих от взаимодействий с этим белком. При данном заболевании рекомендуется проведение импедансной агрегометрии с ристоцетином [8].

Дефекты секреции могут быть обусловлены либо дефицитом тромбоцитарных гранул, либо дефектом в сигнальном пути, регулирующем секрецию и агрегацию тромбоцитов. Дефект плотных гранул наблюдается при синдромах Чедиака–Хигаси, Германского–Пудлака. Агрегационный ответ снижается в ответ на АДФ, адреналин и коллаген, при этом агрегация с ристоцетином в норме [8]. При дефиците α-гранул («синдром серых тромбоцитов»), когда α-гранулы отсутствуют или их число снижено, нарушена коллаген-индуцированная агрегация. При дефекте α-гранул нарушен белковый состав этих гранул и снижена адреналин-индуцированная агрегация [29]. На рисунке 10 видно, что при нарушениях секреции гранул необратимая агрегация сменяется на обратимую в ответ на АДФ и арахидоновую кислоту, значит, обратимая агрегация сигнализирует об отсутствии вторичной активации тромбоцитов.

Агрегометрия – тест, чувствительный к начальной концентрации тромбоцитов; агрегационный ответ пропорционально возрастает при увеличении концентрации тромбоцитов [30], поэтому при проведении

Рисунок 10

Типичные кривые агрегометрии в цитратной плазме в ответ на индукторы агрегации у пациентов с различными заболеваниями (по оси ординат – светопропускание; по оси абсцисс – время) [28]



теста у пациентов с тромбоцитозом рекомендуется разбавлять богатую тромбоцитами плазму до стандартных значений. При тромбоцитопении ответ на все индукторы агрегации снижен [31]. При сильном снижении концентрации тромбоцитов (менее 100 тыс. клеток в 1 мкл) агрегационная кривая уже не достоверна; рекомендуется оценивать агрегацию по среднему размеру агрегатов (ФСП метод) с помощью таких агрегометров, как Биола [32].

При исследовании приобретенных тромбоцитопатий у детей 3–14 лет выявлено снижение степени агрегации по сравнению со взрослыми пациентами: в тестах с АДФ снижение наблюдалось у 70% детей; в тестах с адреналином – у 80%. При этом у 60% детей выявили комбинированные нарушения. При использовании в качестве индуктора агрегации ристоцетина показатель степени агрегации был в пределах нормы [33]. У здоровых детей не выявлено различий в агрегации цитратной богатой тромбоцитами плазмы в зависимости от возраста, однако нам известно только одно подобное сообщение; необходимо провести сравнение с данными из других лабораторий [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа агрегационного ответа тромбоцитов у пациентов с различными заболеваниями можно сделать предположение о механизмах обра-

тимой агрегации тромбоцитов. Дезагрегация тромбоцитов с течением времени наблюдается при отсутствии вторичной активации тромбоцитов, а также в присутствии аспирина либо при лечении аспирином. Таким образом, выявляется зависимость необратимой, устойчивой агрегации тромбоцитов от синтеза тромбоксана A2. В присутствии ионов кальция в ответ на АДФ и серотонин в комбинации с адреналином всегда наблюдается обратимая агрегация, это говорит о том, что синтез тромбоксана A2 в присутствии ионов кальция подавлен.

Исследование механизмов обратимой агрегации важно для оценки получаемых данных агрегации у пациентов, по результатам которых можно предположить дефекты в пути синтеза тромбоксана A2 и вторичной активации тромбоцитов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФ 17-74-20045.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Filkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0448-3981>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Литература

- BORN G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature England* 1962 Jun; 194: 927–9.
- Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. Литтерра, 2011.
- Gao C., Boylan B., Fang J., Wilcox D.A., Newman D.K., Newman P.J. Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -mediated outside-in signaling. *Blood American Society of Hematology* 2011 May 5; 117 (18): 4946–52.
- Cazenave J.-P., Ohlmann P., Cassel D., Eckly A., Hechler B., Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol. United States* 2004; 272: 13–28.
- Zhou L., Schmaier A.H. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma: Description of Procedures With the Aim to Develop Standards in the Field. *Am J Clin Pathol* 2005 Jan 2; 123 (2): 172–83.
- Singh S., Malm C.J., Ramström S., Hesse C., Jeppsson A. Adrenaline enhances in vitro platelet activation and aggregation in blood samples from ticagrelor-treated patients. *Res Pract Thromb Haemost. John Wiley and Sons Inc* 2018 Sep; 30 (4): 718–25.
- Мансуровна Р.Д. Методы определения спонтанной агрегации тромбоцитов. *Вестник современной клинической медицины* 2017; 3.
- Saniabadi A.R., Lowe G.D., Forbes C.D., Prentice C.R., Barbenel J.C. Platelet aggregation studies in whole human blood. *Thromb Res United States* 1983 Jun; 30 (6): 625–32.
- Kauffenstein G., Bergmeier W., Eckly A., Ohlmann P., Leon C., Cazenave J.P., et al. The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin – a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett England* 2001 Sep; 505 (2): 281–90.
- Hechler B., Zhang Y., Eckly A., Cazenave J.-P., Gachet C., Ravid K. Lineage-specific overexpression of the P2Y₁ receptor induces platelet hyper-reactivity in transgenic mice. *J Thromb Haemost England* 2003 Jan; 1 (1): 155–63.
- Baurand A., Raboisson P., Freund M., Leon C., Cazenave J.P., Bourguignon J.J., et al. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y₁ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol Netherlands* 2001 Feb; 412 (3): 213–21.
- Baurand A., Eckly A., Hechler B., Kauffenstein G., Galzi J.-L., Cazenave J.-P., et al. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol Pharmacol United States* 2005 Mar; 67 (3): 721–33.

13. Li Z., Zhang G., Le Breton G.C., Gao X., Malik A.B., Du X. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A2 receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem United States* 2003 Aug; 278 (33): 30725–31.
14. Duvernay M., Young S., Gailani D., Schoenecker J., Hamm H.E. Protease-activated receptor (PAR) 1 and PAR4 differentially regulate factor V expression from human platelets. *Mol Pharmacol United States* 2013 Apr; 83 (4): 781–92.
15. Lanza F., Beretz A., Stierle A., Hanau D., Kubina M., Cazenave J.P. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol United States* 1988 Dec; 255 (6 Pt 2): H1276–88.
16. Cerrito F., Lazzaro M.P., Gaudio E., Arminio P., Aloisi G. 5HT₂-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation. *Life Sci Netherlands* 1993; 53 (3): 209–15.
17. Abajo F. Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on Platelet Function Mechanisms. *Clinical Outcomes and Implications for Use in Elderly Patients* 2011; 28: Drugs & aging: 345–67 p.
18. Roberts D.E., McNicol A., Bose R. Mechanism of Collagen Activation in Human Platelets *J Biol Chem* 2004 May 7; 279 (19): 19421–30.
19. Puett D., Wasserman B.K., Ford J.D., Cunningham L.W. Collagen-mediated platelet aggregation. Effects of collagen modification involving the protein and carbohydrate moieties. *J Clin Invest* 1973 Oct; 52 (10): 2495–506.
20. Paul B.Z., Jin J., Kunapuli S.P. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem. United States* 1999 Oct; 274 (41): 29108–14.
21. Hirata T., Ushikubi F., Kakizuka A., Okuma M., Narumiya S. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest United States* 1996 Feb; 97 (4): 949–56.
22. Hechler B., Leon C., Vial C., Vigne P., Frelin C., Cazenave J.P., et al. The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood United States* 1998 Jul; 92 (1): 152–9.
23. Baurand A., Eckly A., Bari N., Leon C., Hechler B., Cazenave J.P., et al. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y₁ and P2cyc receptors. *Thromb Haemost Germany* 2000 Sep; 84 (3): 484–91.
24. Fine K.M., Ashbrook P.C., Brigden L.P., Maldonado J.E., Didishelm P. Gel-filtered human platelets. Ultrastructure, function, and role of proteins in inhibition of aggregation by aspirin. *Am J Pathol* 1976 Jul; 84 (1): 11–24.
25. Trumel C., Payrastrre B., Plantavid M., Hechler B., Viala C., Presek P., et al. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood United States* 1999 Dec; 94 (12): 4156–65.
26. Filkova A.A., Martyanov A.A., Garzon Dasgupta A.K., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments *Sci Rep* 2019; 9 (1): 6217.
27. Ni R., Vaezzadeh N., Zhou J., Weitz J.I., Cattaneo M., Gross P.L. Effect of Different Doses of Acetylsalicylic Acid on the Antithrombotic Activity of Clopidogrel in a Mouse Arterial Thrombosis Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol United States* 2018 Oct; 38 (10): 2338–44.
28. Столяр М.А., Ольховский И.А. К вопросу определения границ нормальной реакции тромбоцитов в тесте импедансной агрегометрии. *Клиническая лабораторная диагностика* 2016; 6.
29. Савченко А.П., Медведев И.Н. Механизмы функционирования тромбоцитарного гемостаза. *Фундаментальные исследования* 2009; 10.
30. Coêlho M.J.D., Monteiro T. de C., Vasquez F.G., Silva K.L.T., Dos Santos K.S.B., de Oliveira V.M.A., et al. Platelet aggregation and quality control of platelet concentrates produced in the Amazon Blood Bank. *Rev Bras Hematol Hemoter. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2011; 33 (2): 110–4.
31. Rocca B., Bellacosa A., De Cristofaro R., Neri G., Della Ventura M., Maggiano N., et al. Wiskott-Aldrich syndrome: report of an autosomal dominant variant. *Blood United States* 1996 Jun; 87 (11): 4538–43.
32. Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П., Детковская И.Н., Козловский И.В. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию. *Вестник ВГМУ* 2013; 4.
33. Ходулева С.А., Зайцева Л.П., Ромашевская И.П. Некоторые аспекты диагностики тромбоцитопатий у детей. *Проблемы здоровья и экологии* 2007; 4: 34–8.
34. Bonduel M., Frontho J.P., Hepner M., Sciuccati G., Feliu-Torres A. Platelet aggregation and adenosine triphosphate release values in children and adults. Vol. 5, *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH England*; 2007: 1782–3.

© 2019 НМИЦ ДГОИ

Поступила 06.05.2019

Принята к печати 24.06.2019

Современное представление о системе комплемента

С.С. Шахиджанов¹, А.Е. Филиппова¹, А.А. Бутылин², Ф.И. Атауллаханов^{1,2,3,4}¹ ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва⁴ ФГАУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва

Контактная информация:

Шахиджанов Сослан Сергеевич,
научный сотрудник Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.

Адрес: 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: shakhidzhanov.s@yandex.ru

Комплемент представляет собой часть системы иммунитета, обеспечивающую защиту клеток организма от патогенных клеток и частиц. Она запускается при обнаружении вторжения патогенов. Результаты многочисленных исследований привели к осознанию огромной роли этой системы в поддержании нормального функционирования организма. В данном обзоре описано современное представление о работе системы комплемента.

Ключевые слова: система комплемента, пути активации, ингибирование, рецептор, иммунная система

Шахиджанов С.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 130–144.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-130-144

© 2019 by NMRC PHOI

Received 06.05.2019

Accepted 24.06.2019

A modern view on the complement system

S.S. Shakhidzhanov¹, A.E. Filippova¹, A.A. Butilin², F.I. Ataulakhonov^{1,2,3,4}¹ Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow² Lomonosov Moscow State University, Moscow³ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology,

Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

Complement is a part of the immune system which provides host cells with protection against pathogen cells and particles. It is activated when a pathogen invasion is detected. The results of numerous investigations have led to growing realization of the important role of this system in maintaining normal organism homeostasis. This review summarizes a modern view on the complement system.

Key words: complement system, activation pathways, inhibition, receptor, immunity

Shakhidzhanov S.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2019; 18 (3): 130–144.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-130-144

Система комплемента была открыта в 1894 году бельгийским иммунологом и бактериологом, лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине *Жюлем Борде* [1]. Она была названа комплементом, поскольку представляла собой неустойчивое к нагреву дополнение к антителам, устойчивым к нагреву, которые совместно приводили к опсонизации и убийству бактерий.

В процессе эволюции система комплемента возникла у общего предка настоящих многоклеточных (*Eumetazoa*) более 500 млн лет назад [2]. Она появилась в виде гена белка, содержащего сложную тиоэфирную связь (TEP – *thioester-bond containing protein*), который в процессе дупликации генов сформировал суперсемейство белков, состоящее из генов C3, C4, C5 (белки системы комплемента), не связанных с комплементом генов белков A2M (альфа-2-макроглобулин – *alpha-2-Macroglobulin*) и CD109. Возможно, в то время механизм защиты состоял в том, что при попадании в организм патогена его протеиназы могли приводить к расщеплению белка C3, а затем к опсонизации патогенных клеток фрагментами белка C3, которые могли распознаваться макро-

фагами [3]. В дальнейшем у морских ежей появился ген сериновой протеиназы FB (*factor B*; фактор В), который затем превратился в семейство из двух генов, кодирующих белки комплемента FB и C2 [4]. Вероятно, FB участвовал в процессе расщепления C3, усиливая тем самым опсонизацию патогена фрагментами белка C3 [3]. У асцидий появился ген сериновой протеиназы MASP (*mannan binding protein associated serine protease*), который затем образовал семейство из пяти генов белков системы комплемента: MASP-1, MASP-2, MASP-3, C1r и C1s [4]. В это же время появились белки, которые могли распознавать последовательности углеводов, свойственные патогенам, и активировать белки MASP, которые также расщепляли C3. Фагоцитоз макрофагами патогенов, опсонизированных фрагментами C3, продолжал оставаться единственным механизмом их устранения до тех пор, пока у первых челюстных позвоночных не появились белки системы комплемента, способные образовывать отверстия в мембране патогенной клетки и приводить к ее лизису [4].

У человека система комплемента – компонент иммунной системы, важный механизм, обеспечива-

ющий взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета [5]. Она представляет собой набор белков (более 40 разных видов), как растворенных в плазме крови, так и экспрессируемых на мембранах клеток организма [6, 7]. Эти белки взаимодействуют между собой и формируют сложный каскад биохимических реакций. В начале этого каскада находятся белки, выполняющие роль детекторов, распознающих различные молекулярные паттерны, свойственные патогенным клеткам и частицам. Активация белков-детекторов приводит к запуску каскада протеолитических реакций, который многократно усиливает даже самый слабый первичный сигнал, что позволяет системе мощно реагировать даже на ничтожное число патогенов и нарабатывать миллионы фрагментов белков системы комплемента, опсонизирующих мембрану патогена. В конце каскада происходит образование большого числа отверстий в мембране патогена, что приводит к его лизису.

Кроме того, существует важная группа белков – регуляторов активности системы комплемента (*regulators of complement activity* – RCA). Основная функция большинства ее белков – ингибирование активации системы комплемента и защита клеток организма от ее активности [6, 7]. Исключение составляет один белок из этой группы – пропердин, или фактор P, наоборот, усиливающий активацию этой системы. Совместная работа белков RCA должна быть чрезвычайно точной и слаженной: с одной стороны, система комплемента обязательно должна уничтожить попавший в организм патоген, а с другой – ни в коем случае нельзя допустить повреждения собственных клеток организма. Это достаточно сложная задача, поскольку необходимо соблюсти два противоречащих требования. Для адекватной защиты организма от патогенов необходимо, чтобы система комплемента могла активироваться с максимальной силой на мембране патогена с целью его уничтожения с максимальной скоростью и наибольшей вероятностью. Однако, в противовес этому, важно не допустить случайной активации системы комплемента на собственных клетках организма, поскольку это может нанести ему вред.

Часть белков RCA растворена в плазме, и благодаря их оригинальному устройству они могут регулировать активность комплемента в плазме и на мембранах клеток [6, 7]. Другая часть белков RCA находится непосредственно на мембранах клеток организма и представляет собой последнюю линию обороны для защиты от избыточной активности системы комплемента [6, 7]. Нарушения в работе белков RCA приводят к развитию очень тяжелых заболеваний, таких как атипичный гемолитико-уремический синдром [8] или пароксизмальная ночная гемоглобинурия [9]. Их лечение требует пожизненного приема очень

дорогостоящего лекарства (экулизумаба) [10, 11] или диализа [12, 13]; в некоторых случаях может помочь пересадка органов. В отсутствие лечения эти заболевания приводят к развитию терминальной стадии почечной недостаточности и даже смерти.

С другой стороны, заболевания системы комплемента могут приводить к значительному снижению ее активности в отношении патогенных клеток. Это происходит по разным причинам, например, из-за снижения уровня белков, распознающих патогены, из-за недостаточного усиления первичного сигнала протеолитическим каскадом или нарушений в образовании литических отверстий в мембране патогена. В этом случае организм может быть подвержен различным инфекционным заболеваниям (в особенности инфекциям, вызываемыми *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *N. Gonorrhoeae*) [14]. Снижение активности системы комплемента может также привести к развитию ревматизма и системной красной волчанки [15].

В этом обзоре мы осветили современные представления об основах работы системы комплемента и рассмотрели, каким образом в этой системе может поддерживаться баланс между активацией и ингибированием активности комплемента.

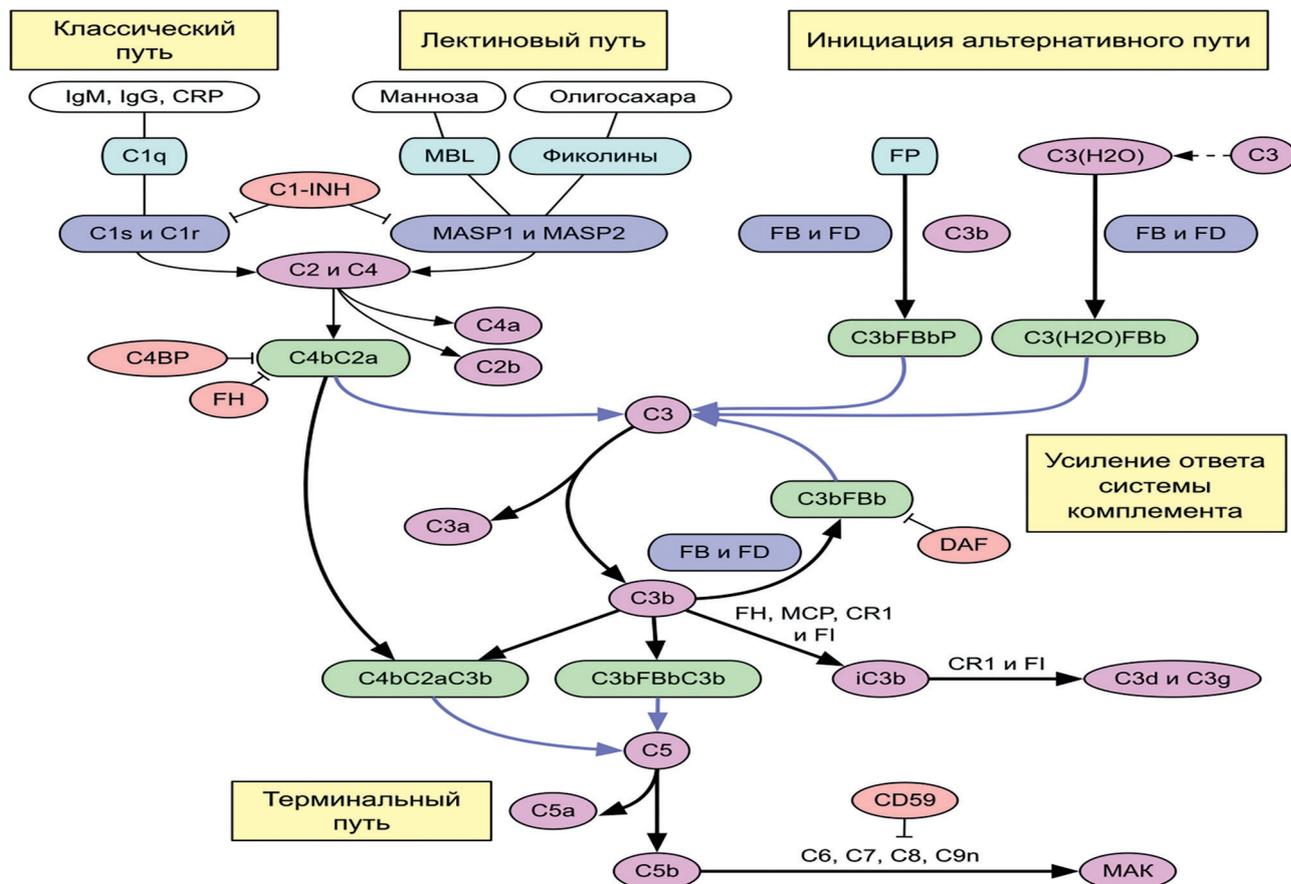
Три пути активации системы комплемента

На сегодняшний день известны три основных пути активации системы комплемента – классический, лектиновый и альтернативный (*рисунок 1*).

Классический путь. Его активация в основном начинается со связывания антител IgM и/или IgG с антигеном [5]. В дальнейшем процессе активации участвует белковый комплекс, названный C1, который состоит из нескольких белков: C1q, двух белков C1r и двух белков C1s [16, 17]. Молекула C1q представляет собой большой гексамер (460 000 Да), внешне напоминающий букет из шести цветков (*рисунок 2*). Отдельные «цветки» этого букета – глобулярные головки, которые могут связываться в основном с Fc-концами антител IgG [18] и доменами C μ 3 [19] и C μ 4 [20] антител IgM. Связывание C1q с IgM и IgG различно по своей силе: связывание C1q с IgM – довольно прочное, а связывание C1q с IgG – довольно слабое. Различие в силе связывания возникает из-за того, что одна глобулярная головка C1q может связаться лишь с одним концом Fc. Однако силы этого связывания недостаточно для того, чтобы C1q мог закрепиться на мембране патогена. В то же время наличие сразу пяти Fc-концов у IgM приведет к возникновению кооперативных взаимодействий – сразу несколько глобулярных головок смогут принять участие в связывании C1q и IgM, что значительно повысит силу закрепления Fc и C1q (было показано, что в связывании с IgM принимают участие

Рисунок 1

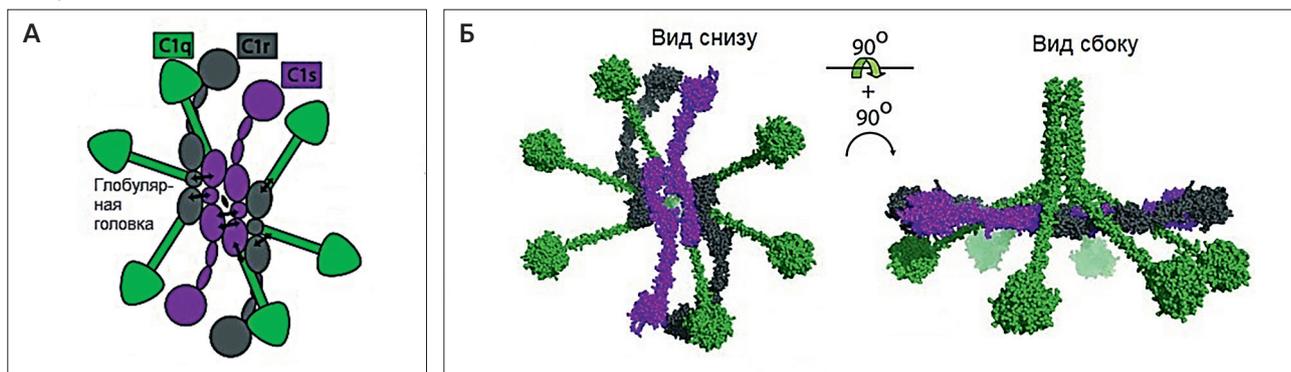
Схема системы комплемента [28, с изменениями]



Классический путь начинается со связывания антител IgM и/или IgG со своими эпитопами, а также может активироваться связыванием CRP с поверхностью клетки; далее происходит связывание белка C1q и последовательная активация C1r и C1s. Активированные C1s расщепляют белки C4 и C2 на фрагменты C4b и C4a, C2a и C2b соответственно. Из фрагментов C4b и C2a формируется C3-конвертаза классического пути C4bC2a, которая может расщеплять белок C3 на два фрагмента – C3b и C3a. Лектиновый путь запускается связыванием MBL или фиколинов с различными углеводами; в дальнейшем происходит активация MASP1 и MASP2, которые расщепляют C2 и C4 на те же C4b, C4a, C2a и C2b, и происходит сборка C3-конвертазы классического пути C4bC2a. Ингибиторы C4BP и FH ускоряют распад C4bC2a и предотвращают ее сборку. Активация альтернативного пути начинается со спонтанного гидролиза C3, не зависящего от присутствия в организме патогенных клеток. С помощью факторов В и D происходит образование изначальной «initial» C3-конвертазы альтернативного пути C3(H₂O)FBb, которая может расщеплять белок C3 на те же два фрагмента – C3b и C3a. На следующей стадии происходит усиление ответа системы комплемента от всех путей активации. Расщепление белка C3 и образование фрагмента C3b приводит к запуску петли положительной связи системы комплемента и лавинообразному нарастанию концентрации C3b. При участии белков фактора В и фактора D образуется C3-конвертаза альтернативного пути C3bFBb, которая может расщеплять новые C3. Этот процесс регулируется ингибиторами DAF, FH, MCP, CR1 и FI. При лавинообразном нарастании количества C3b этот фрагмент на поверхности клеток начинает связываться с C3-конвертазами C4bC2a и C3bFBb с образованием C5-конвертаз C4bC2aC3b и C3bFBbC3b. Здесь начинается терминальная стадия активации комплемента: расщепление C5 на фрагменты C5a и C5b приводит к последовательному связыванию с C5b белков C6, C7, C8 и нескольких C9, в результате чего в мембране патогенной клетки собирается мембраноатакующий комплекс (МАК), приводящий к лизису патогена. Сборка может ингибироваться белком CD59.

Рисунок 2

Схематическое представление доменной структуры молекулы C1 (А); структура молекулы C1, полученная с помощью малоуглового рассеяния (Б) [16]



две и более глобулярные головки C1q) [21]. Следует отметить, что связывание C1q с IgM происходит только в том случае, если IgM закреплен на поверхности патогена, и не происходит в плазме. Предполагается, что IgM при связывании с поверхностью антигена меняет свою конформацию таким образом, что становится возможным связывание IgM с C1q [22, 23].

У антитела IgG имеется лишь один фрагмент Fc, поэтому для закрепления C1q на мембране и его активации важна плотность посадки IgG на поверхность патогена. В работах [24, 25] показано, что при достаточно высокой плотности посадки молекулы IgG, диффундируя по мембране патогена вместе со своим эпитопом, начинают собираться в структуры, напоминающие по виду антитело IgM. Именно в этот момент молекула C1q получает возможность связаться одновременно с несколькими IgG, находящимися поблизости, и такое связывание будет достаточно прочным для запуска активации классического пути системы комплемента. Кроме того, классический путь системы комплемента может активироваться с помощью белка CRP (С-реактивный белок – *C-reactive protein*). CRP – это белок острой фазы воспаления, он может связываться с фосфатидилхолином на поверхности некоторых бактерий. При достаточно высокой плотности CRP на поверхности патогена C1q сможет прочно связаться с двумя соседними молекулами CRP [26], что приведет к активации комплемента по классическому пути.

Другие компоненты белкового комплекса C1 – C1r и C1s – это сериновые протеиназы, изначально находящиеся в виде проферментов. Эти белки собираются в вытянутую молекулу-тетрамер C1s-C1r-C1r-C1s [27], которая закрепляется ($K_a \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$) между «стеблей букета» молекулы C1q (рисунки 2). При достаточно прочном связывании C1q с антителами или CRP происходит автоактивация проферментов C1r, они переходят в активированную форму C1r* и расщепляют, тем самым активируя C1s [29]. Предположительно, после активации тетрамер C1s-C1r-C1r-C1s меняет свою конформацию таким образом, что активированные C1s* начинают выступать далеко за пределы «конуса» белка C1q [17]. Это позволяет ферменту C1s* начать эффективно расщеплять следующие компоненты системы комплемента – C2 и C4.

Компонент системы комплемента C4 – это белок, растворенный в плазме. У него есть замечательная особенность: остатки аминокислот глутамина и цистеина из его аминокислотной последовательности образуют сложную тиоэфирную связь в гидрофобной области белка C4 [30]. При расщеплении C4 с помощью фермента C1s* на два фрагмента – C4a (8759 Да) и C4b (~195000 Да) – происходит конформационная перестройка белка, благодаря которой сложный тиоэфир, находящийся во фрагменте C4b, получает

возможность связываться с гидроксильными и аминогруппами (важную роль катализатора здесь играет остаток соседней аминокислоты гистидина) с образованием амидных и сложноэфирных связей. Это приводит к тому, что фрагмент C4b может ковалентно «пришиться» к мембране патогена, например, прямо к антителу, связанному с поверхностью патогена [31]. Фрагмент C4a представляет собой растворимый пептид (анафилаксин), который может принимать участие в активации клеток иммунитета.

Фермент C1s* может также расщеплять белки плазмы C2, однако эффективность такого расщепления не очень велика. Она повышается примерно в 16 раз, когда сначала молекула C2 связывается с ковалентно закрепленным на патогене C4b (образуется связанный с мембраной комплекс C4bC2), и затем C2 (в составе C4bC2) расщепляется с помощью C1s* [32]. Расщепление приводит к образованию двух фрагментов: C2b (30000 Да), который уходит в плазму, и C2a (70 000 Да), который остается связанным с C4b (формируется комплекс C4bC2a). Комплекс C4bC2a – это фермент, который играет огромную роль в процессе дальнейшей активации системы комплемента и называется C3-конвертазой классического пути. У C4bC2a есть время жизни, в течение которого этот фермент активен. Инактивация C4bC2a происходит из-за спонтанного распада на C4b и C2a. Время жизни определяется с помощью показателя $t_{1/2}$ – времени, в течение которого инактивируется 50% C4bC2a, и составляет менее 3 мин [33]. После этого к C4b может снова присоединиться новая молекула C2, и весь процесс повторяется.

C3 – это еще один белок, который по праву можно назвать самым главным белком, поскольку на нем пересекаются все пути активации комплемента. C3-конвертаза C4bC2a расщепляет белок C3 на два фрагмента – C3a и C3b. Фрагмент C3a – это пептид (9089 Да), также являющийся анафилаксин, участвующим в активации клеток иммунитета. Фрагмент C3b (176000 Да) участвует в развитии дальнейших процессов активации комплемента. Протеаза C4bC2a может расщеплять еще один белок системы комплемента – C5 – на фрагменты C5a (8268 Да) и C5b (181000 Да), однако эффективность такого расщепления очень невелика [34].

Белок C3 так же, как и C4, содержит сложную тиоэфирную связь [30, 35]. При расщеплении C3 на две части фрагмент C3b получает возможность ковалентно связаться с поверхностью патогена. В классическом пути C3b, ковалентно связанный с мембраной, может взаимодействовать с ковалентно связанным с мембраной C4bC2a, образуя комплекс C4bC2aC3b. В этот момент у фермента C2a, находящегося в комплексе C4bC2aC3b, резко увеличивается аффинность к C5, и он начинает очень эффективно

расщеплять C5 (его активность относительно C5 увеличивается примерно в 1000 раз) и практически прекращает расщеплять C3 (происходит переключение расщепления с C3 на C5) [34]. Фермент C4bC2aC3b называется C5-конвертазой классического пути. Она расщепляет C5 на уже упоминавшиеся выше два фрагмента – C5a и C5b: C5a – это короткий пептид, анафилатоксин, а C5b играет важную роль в образовании отверстий в мембране патогена.

В отличие от C3 и C4, белок C5 не имеет сложной тиозэфирной связи, поэтому он не может ковалентно связаться с мембраной [36, 37]. Фрагмент C5b уходит в плазму, где связывается с белком C6 (образуется комплекс C5bC6), а затем с ними связывается белок C7 (образуется комплекс C5bC6C7). При связывании C7 с C5bC6 происходит конформационная перестройка C7, которая активирует его и переводит в амфифильное состояние [38, 39], при этом он становится достаточно хорошо растворимым как в воде, так и в липидах мембраны. В результате комплекс C5bC6C7 прикрепляется к фосфолипидному бислою клетки за счет гидрофобных сил. Если такого прикрепления не происходит, то C5bC6C7 связывается с S-белком, растворенным в плазме, что делает C5bC6C7 растворимым, но блокирует дальнейшее образование отверстий в мембране клетки (несмотря на то что к нему присоединяются белки C8 и C9, участвующие в следующих этапах образования отверстия). Затем к комплексу C5bC6C7 присоединяется белок C8 (образуется C5bC6C7C8). C8 – это первый белок, который пробивает мембрану клетки насквозь. Структура одного из доменов C8 (домен MACPF) гомологична белку перфорину, который содержится в гранулах Т-лимфоцитов и NK-лимфоцитов, и также гомологична бактериальным холестерин-зависимым цитолизинам [40]. После этого к C5bC6C7C8 присоединяются от 10 до 18 белков C9, которые тоже встраиваются в мембрану клетки и собираются в кольцо – пору – диаметром около 10 нанометров, представляющую собой сквозное отверстие в мембране патогенной клетки [41, 42]. Эта пора называется мембраноатакующим комплексом (МАК). Встраивание МАК в мембрану клетки приводит не только к нарушению осмотического баланса (и возможному лизису), но и к выходу в плазму большинства внутриклеточных молекул и белков, что ведет к гибели клетки.

Лектиновый путь. В целом лектиновый путь очень похож на классический путь активации комплемента, лишь с тем отличием, что в качестве «паттернов» распознавания патогена выступают полимеры моносахаров, соединенных α -гликозидными связями, – гликаны, часто встречающиеся на мембранах бактерий и редко появляющиеся на мембранах клеток организма. Так, например, гликаны дрожжей часто оканчиваются маннозой, а гликаны

клеток человека – сиаловыми кислотами [43]. Один из белков, запускающих активацию по лектиновому пути, – лектин, связывающий маннозу (*mannose-binding lectin* – MBL). По строению он очень похож на C1, но обычно состоит из трех или четырех «цветков в букете». На концах «цветков» MBL находятся домены, распознающие различные ассоциируемые с патогенами паттерны углеводов. По аналогии с C1, стабильное связывание MBL с мембраной патогена и его активация происходят только при достаточно высокой плотности лигандов на поверхности бактерии. С MBL могут быть связаны три изначально неактивные сериновые протеазы – MASP-1, MASP-2 и MASP-3 (*MBL-associated serine proteases*).

Важная особенность лектинового пути – это то, что с большей частью (~70%) молекул MBL связана только MASP-1 или только MASP-2 [44]. Когда MBL связывается с поверхностью патогена, происходит автоактивация фермента MASP-1. В физиологических условиях MASP-1 необходим для активации MASP-2. Кроме того, MASP-1 и MASP-2 могут расщеплять C2, но только MASP-2 может расщеплять C4. Это означает, что эффективное расщепление одновременно C2 и C4 возможно только в том случае, когда комплекс MBL с MASP-1 и комплекс MBL с MASP-2 окажутся в непосредственной близости друг от друга [45].

Роль MASP-3 в процессе активации лектинового пути изучена плохо. Следует отметить также, что MBL – белок острой фазы; в норме в плазме он может практически отсутствовать без каких-либо последствий [44].

Есть и другие белки, запускающие активацию комплемента по лектиновому пути, – фиколины. Существует три их типа: L-фиколин, M-фиколин и H-фиколин. Все они специфично связываются с различными олигосахаридами, содержащими ацетилированные сахара [44]. По строению они схожи с MBL; с ними связаны протеазы MASP-1 и MASP-2.

Альтернативный путь. Альтернативный путь активации системы комплемента значительно отличается от классического и лектинового. Он связан с внутренним устройством молекулы C3. Как упоминалось выше, у C3 имеется сложная тиозэфирная связь, которая может быть спонтанно гидролизована молекулой воды. Скорость этого гидролиза не очень высока: примерно 0,3% C3 превращается в C3(H₂O) за 1 час [46]. Процесс стохастического гидролиза C3 в англоязычной литературе называется «*tick-over*». После того как спонтанный гидролиз произошел, у C3(H₂O) меняется конформация – к нему может прикрепиться белок фактор В (FB), что приведет к образованию комплекса C3(H₂O)FB [47–49]. Далее сериновая протеиназа фактор D может расщепить фактор В, находящийся в составе C3(H₂O)FB,

с образованием двух фрагментов – FBa (33 000 Да) и FBb (60000 Да). Фрагмент FBa уходит в плазму, а фрагмент FBb остается в составе комплекса и является активированной сериновой протеиназой [50]. Получившийся комплекс C3(H₂O)FBb называется изначальной («initial») C3-конвертазой альтернативного пути; он может расщеплять белок C3 на упоминавшиеся выше два фрагмента – C3b и C3a [51]. Таким образом, в плазме всегда присутствует небольшое количество C3-конвертаз, которые постоянно производят небольшое количество C3a и C3b. У C3(H₂O)FBb тоже есть $t_{1/2}$ – чуть более 1 мин [51].

Усиление сигнала. Далее следует один из важнейших этапов активации системы комплемента – этап многократного усиления начального сигнала. К фрагменту C3b может присоединяться молекула FB с образованием комплекса C3bFB. Фактор В в комплексе C3bFB может быть расщеплен фактором D с образованием C3bFBb. Комплекс C3bFBb называется C3-конвертазой альтернативного пути, поскольку он может расщеплять C3 на все те же два фрагмента – C3a и C3b. К новому C3b может присоединиться фактор В, он расщепляется фактором D, и образуется еще одна C3-конвертаза – C3bFBb [5]. Таким образом, в альтернативном пути системы комплемента есть петля положительной обратной связи: образование небольшого количества C3b будет приводить к образованию C3bFBb, которые ведут к образованию новых C3b, из которых получатся новые C3bFBb и т.д. Процесс увеличения концентрации C3bFBb становится лавинообразным. C3bFBb тоже может спонтанно распадаться на C3b и FBb; его $t_{1/2}$ составляет 1,5 мин [51]. C3bFBb может также расщеплять C5, но очень неэффективно [52].

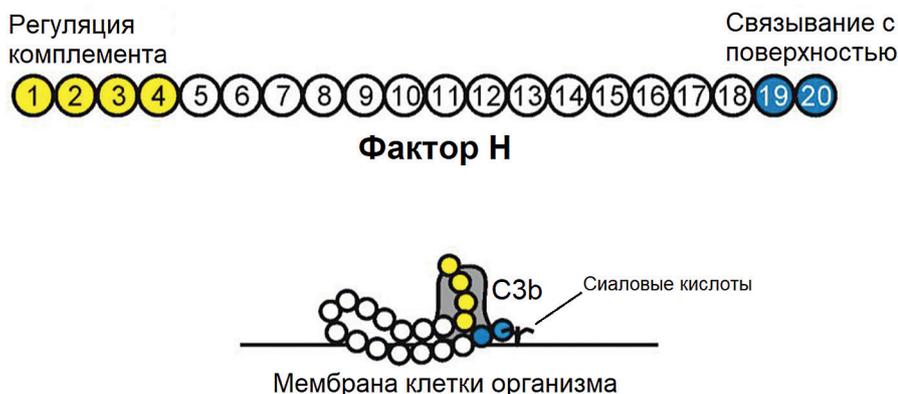
Таким образом, из-за наличия петли положительной обратной связи система комплемента, имея даже очень небольшое количество C3(H₂O), которое есть всегда, должна сразу лавинообразно активироваться. Однако в организме этого не происходит. Очень

важную роль здесь играет ингибитор активации системы комплемента – фактор Н (FH) (рисунки 3), большой вытянутый белок (155000 Да), состоящий из 20 практически одинаковых доменов белка контроля комплемента (*Complement Control Protein – CCP*). Отметим, что домены CCP играют центральную роль в регуляции системы комплемента: практически все регуляторы этой системы состоят из разного количества последовательно соединенных доменов CCP [53]. Фактор Н, присоединяясь к комплексу C3bFBb, может вытеснить из него молекулу FBb (это ускоряет распад C3bFBb). Также фактор Н, связанный с C3b (комплекс C3bFH), закрывает собой сайт связывания FB, что блокирует присоединение новых молекул FB к C3b. В дальнейшем C3b в составе комплекса C3bFH может быть расщеплен ферментом фактор I (FI), что приводит к полной инактивации C3b. Так в организме ингибируется лавинообразная активация системы комплемента по альтернативному пути. Аналогичным образом FH может ингибировать C3(H₂O)FBb [54].

Альтернативный путь, как известно, активируется при попадании в организм определенных патогенов [5]. Здесь по-прежнему центральную роль играет фактор Н [55]. На 19–20 доменах CCP фактора Н есть сайты связывания с сиаловыми кислотами (рисунки 3) [56–59]. Эти кислоты в норме находятся на поверхности клеток организма человека и отсутствуют на мембранах многих патогенов. Когда комплекс C3bFBb ковалентно пришит за амино- или гидроксильную группу к мембране клетки, фактору Н надо закрепиться одновременно за C3bFBb и за сиаловые кислоты, чтобы эффективно ингибировать активность C3bFBb [59], но на мембранах клеток патогена это невозможно, поскольку сиаловые кислоты у них отсутствуют. Таким образом, альтернативный путь активации системы комплемента может различать свои и чужие клетки – фактор Н «узнает» свои клетки и защищает их от активации системы комплемента. В то же время на патогенных клетках, где FH неакти-

Рисунок 3

Схематичное представление структуры фактора Н [60, с изменениями]



Фактор Н состоит из 20 доменов CCP: первые четыре домена CCP участвуют в регуляции активности системы комплемента; домены CCP 19 и 20 связываются с сиаловыми кислотами на мембранах клеток организма, что приводит к более крепкому связыванию фактора Н с C3b.

вен, даже небольшое образование C3bFBb приведет к лавинообразному нарастанию количества C3bFBb, пока клетка не будет уничтожена.

Дальнейшие процессы активации комплемента по альтернативному пути очень похожи на те, что происходят по классическому пути. Ковалентно пришитая к мембране молекула C3b может образовывать комплекс с пришитой к мембране C3-конвертазой C3bFBb – C3bFBbC3b, причем этот процесс зависит от плотности C3bFBb на мембране клетки [61]. В составе этого комплекса у FBb меняется аффинность к C5 (эффективность расщепления C5 возрастает более чем в 1000 раз – происходит переключение расщепления с C3 на C5) [52], и C3bFBbC3b превращается в C5-конвертазу альтернативного пути, которая расщепляет C5 на те же C5a и C5b. Молекула C5b участвует в уже упомянутом процессе образования мембраноатакующего комплекса.

Отметим важную особенность, касающуюся C5-конвертаз системы комплемента. На данный момент молекулярный процесс их формирования непонятен, хотя на этот счет есть некоторые предположения [62]. Однако показано, что C5-конвертазы могут образовываться только на поверхности патогена; растворимые формы C5-конвертаз практически не образуются [61]. В то же время C3-конвертазы могут образовываться как в плазме, так и на мембране патогена (хотя для C3-конвертаз классического пути C4bC2a это менее вероятно – как было сказано выше, эффективное образование C4bC2a возможно, если C4b ковалентно закреплен на мембране и находится близко от активированного C1*). Это означает, что при формировании МАК действует еще один важный механизм отбора: для его образования необходима поверхность, с которой сможет ковалентно связаться большое количество C3b, – это необходимо для формирования C5-конвертаз и сборки МАК.

Важную роль в активации системы комплемента по альтернативному пути играет также белок пропердин. Его основная функция – связывание с C3/C5-конвертазами альтернативного пути и их стабилизация. Это увеличивает время их жизни и замедляет ингибирование с помощью фактора Н (стабилизация пропердином увеличивает время жизни C3bFBb в 5–10 раз) [63]. На сегодняшний день имеются данные о том, что пропердин может распознавать различные паттерны на мембранах клеток патогенов – это тоже может приводить к активации системы комплемента по альтернативному пути [64, 65].

Белок C3 в системе комплемента играет особую роль усилителя начального сигнала. Все пути активации комплемента сходятся в одну точку – петлю положительной обратной связи, лавинообразно усиливающую начальный сигнал. Благодаря этой петле усиливаются также лектиновый и классический пути

активации – около 90% МАК образуются благодаря C5-конвертазам альтернативного пути [66].

Ингибиторы системы комплемента. Адекватная регуляция активации системы комплемента крайне важна для нормального функционирования этой системы и организма в целом. Нарушения этой регуляции могут привести к развитию чрезвычайно тяжелых заболеваний, таких как атипичный гемолитико-уремический синдром и пароксизмальная ночная гемоглобинурия [28, 67, 68]. Их развитие связано с различными нарушениями регуляции активности системы комплемента, вследствие чего активность этой системы становится опасной для собственных клеток организма. В норме они защищены большим количеством ингибиторов системы комплемента.

Важный ингибитор классического и лектинового путей системы комплемента – C1-INH (серпин). В классическом пути ингибирование происходит за счет необратимого связывания C1-INH с активированными C1s и C1r, являющимися частью упомянутого выше комплекса C1, в результате этого происходит их полная инактивация [69–71]. Было показано, что C1-INH также чувствителен к типу поверхности, на которой происходит ингибирование [72]. Так, например, C1-INH ингибирует активацию C1 на молекулах ДНК и гепарине, но практически не ингибирует активацию на патогенных клетках и иммунных комплексах. C1-INH может также ингибировать активные MASP-1 и MASP-2 из лектинового пути активации [73, 74].

Еще один ингибитор активации классического пути – C4-связывающий белок (C4 binding protein – C4BP). Это очень большой белок (540 000 Да), растворенный в плазме; внешне он напоминает «паука» – из центральной его части расходятся семь длинных белковых цепей, состоящих из восьми доменов CCP [75]. Этими белковыми цепями он может связываться сразу с несколькими молекулами C4b (но не более чем с четырьмя сразу) [76]. По своим функциям он напоминает фактор Н: может ускорять распад C3-конвертазы классического пути, ингибировать и блокировать связывание новых молекул C2 с C4b. В комплексе с C4b он формирует субстрат для фактора I (и является кофактором), который расщепляет C4b на два фрагмента – C4d и C4c, которые в дальнейшем не принимают участия в активации системы комплемента.

Один из важнейших ингибиторов альтернативного пути – фактор Н – упоминался выше. Этот белок, растворенный в плазме, ингибирует сборку C3-конвертазы альтернативного пути и ускоряет ее распад. Присоединяясь к C3b, фактор Н выполняет роль кофактора для еще одного важного ингибитора системы комплемента – фактора I, сериновой протеиназы,

циркулирующей в плазме в уже активированном виде [77]. Фактор I, присоединяясь к комплексу C3bFH, расщепляет C3b на два фрагмента – iC3b (176 000 Да) и C3f (2 000 Да) [78]. Если C3b до расщепления был связан с мембраной, то и iC3b останется связанным с мембраной. Фрагмент iC3b больше не может связывать фактор В, но это важный маркер для макрофагов, который будет находиться непосредственно на мембране патогенной клетки. В присутствии кофактора CR1 фактор I проявляет активность в отношении iC3b, который он может расщепить еще на два фрагмента – C3с и C3dg [79], причем C3dg остается связанным с мембраной. Далее фермент плазмин расщепляет C3dg еще на два фрагмента – C3d (остается связанным с мембраной) и C3g. Другим важным кофактором для фактора I является уже упомянутый ингибитор C4BP, с помощью которого он может расщепить C4b на два фрагмента – C4d (45000 Да) и C4с (140 000 Да) [80–82]. Фрагмент C4с уходит в плазму, а C4d остается связанным с мембраной и больше не может связывать молекулу C2.

Другие важные ингибиторы системы комплемента – белки DAF (*decay accelerating factor* – CD55), MCP (*membrane cofactor for protein* – CD46), CR1 (*complement receptor 1* – CD35) и CD59. Они расположены на мембранах клеток организма и непосредственно на месте защищают их от атаки системы комплемента [6]. Эти белки не только сдерживают избыточную активность системы комплемента, вызванную возможным вторжением патогенных клеток, но и защищают собственные клетки от постоянной активности альтернативного пути.

Ингибитор DAF состоит из четырех доменов CCP [83]; главная его функция – ускорять распад C3-конвертаз альтернативного пути C3bFBb [84, 85]. Однако, в отличие от фактора H, DAF не является кофактором для фактора I – комплекс C3bDAF не образует субстрат для FI [7]. Экспрессируется большинством типов клеток, включая эритроциты, тромбоциты, эпителиальные и эндотелиальные клетки [8, 86].

Ингибитор CD59, который иногда называют протектином, связывается с C8 и блокирует связывание с комплексом белка C9, что в свою очередь предотвращает последующую сборку мембраноатакующего комплекса [87–89]. Экспрессируется на эритроцитах, тромбоцитах и большинстве ядерных клеток, включая клетки почек [8, 86].

Важная особенность DAF и CD59 состоит в том, что оба эти ингибитора имеют гликозилфосфатидилинозитол, представляющий особый тип «якоря», связывающего эти белки с мембраной клеток. Мутация в белке, который обеспечивает связывание гликозилфосфатидилинозитола в клеточной мембране, приводит к отсутствию сразу двух этих ингибиторов системы комплемента на поверхности клеток орга-

низма, провоцируя развитие пароксизмальной ночной гемоглобинурии [9, 67].

Другой важный мембранный ингибитор – MCP (*membrane cofactor protein* – CD46) – состоит из четырех доменов CCP и цитоплазматического якоря [90]. Поскольку MCP может связываться как с C4b, так и с C3b, и выступать в роли кофактора для фактора I для C4b и C3b, то он может ингибировать активацию системы комплемента на мембранах клеток организма по классическому, лектиновому и альтернативному путям [91]. Экспрессируется всеми клетками, кроме эритроцитов [8].

Следующий важный ингибитор – мембранный белок CR1 (*complement receptor 1* – CD35); он состоит из 30 доменов CCP и цитоплазматического якоря. Домены CCP 1–3 ответственны за связывание с C4b и ускорение распада C3-конвертазы классического пути, а домены 8–10 и 15–17 могут связываться с C3b, iC3b и C4b и выступать в роли кофактора для фактора I [92]. Этот рецептор может связываться с C1q. Экспрессируется большинством ядерных клеток, эритроцитами, В-клетками, лейкоцитами, моноцитами и фолликулярными дендритными клетками [8]. Несмотря на то что этот белок называется рецептором, он не способен без дополнительных сигналов вызвать активацию фагоцитоза [93].

Перенос активности системы комплемента на соседние клетки. В системе комплемента, как уже было сказано, должен соблюдаться очень точный баланс между активацией и ингибированием. При заболеваниях системы комплемента этот баланс смещается в ту или иную сторону. Недостаточно сильная активация системы комплемента может стать причиной того, что организм будет подвержен инфекционным заболеваниям, а недостаточная регуляция активации комплемента может привести к повреждению собственных клеток. Однако для повреждения собственных клеток активные факторы системы комплемента (например, C3b) должны каким-то образом попасть на мембраны клеток организма, чтобы сформировать там C3/C5-конвертазу и МАК (как сказано выше, для сборки МАК C5-конвертаза должна сформироваться именно на поверхности).

Механизм переноса активности на соседние клетки связан со способностью C3b образовывать ковалентную связь с мембраной клетки. Уже упоминавшаяся сложная тиоэфирная связь в C3b либо связывается с мембраной клетки, либо гидролизует молекулой воды, это ведет к тому, что C3b больше не сможет связаться с мембраной и станет растворимым. Отметим, что этот гидролиз произойдет не сразу (время, за которое 50% C3b гидролизуются, – около 60 микросекунд), поэтому C3b может отплыть от места активации примерно на 60 нанометров, прежде чем 50% этих молекул потеряют возможность

связаться с мембраной клетки [94]. Это очень небольшое расстояние, однако если в непосредственной близости от патогенной клетки будет находиться незащищенная клетка организма (например, из-за заболевания, связанного с мутацией в каком-либо ингибиторе комплемента), то на ее поверхности может произойти «раскрутка» петли положительной обратной связи до тех пор, пока вся ее поверхность не окажется опсонизированной фрагментами системы комплемента [95]. После этого может произойти перенос следующих молекул C3b на другую соседнюю клетку. Кроме того, комплекс C5bC6C7 может диффундировать на расстояние около 600 нанометров, прежде чем 50% C5bC6C7 потеряют возможность связаться с мембраной клетки [94].

Рецепторы системы комплемента. Система комплемента защищает организм от патогенных клеток не только с помощью мембраноатакующего комплекса, который может вызывать их лизис. Другой важный и эволюционно более древний механизм – опсонизация патогенных клеток большим количеством молекул системы комплемента, например, ковалентно связанными с мембраной молекулами C3b, iC3b и C3d [5]. Эти молекулы – важные маркеры для фагоцитов, которые имеют на своей поверхности соответствующие рецепторы к этим молекулам. Эти рецепторы относятся к трем различным классам молекул: рецептор CR2, состоящий из доменов CCP; рецепторы из семейства интегринов CR3 и CR4 и рецепторы из суперсемейства иммуноглобулинов CRlg [7].

CR2 (*complement receptor 2* – CD21) экспрессируется В-клетками, Т-клетками и фолликулярными дендритными клетками [8]. Этот рецептор может взаимодействовать с ковалентно связанными с поверхностью антигенами iC3b, C3dg и C3d. На мембранах В-клеток он формирует корецептор – комплекс с CD19 и CD81 – и способен понижать порог активации В-клеток в 1000–10 000 раз [96–98].

Семейство интегринов CR3 (CD11b/CD18, или $\alpha_M\beta_2$) и CR4 (CD11c/CD18, или $\alpha_X\beta_2$) – это гетеродимерные трансмембранные комплексы, составленные из разных CD. Оба этих рецептора могут связываться с iC3b, и оба необходимы для фагоцитоза фрагментов C3, а также иммунных комплексов и патогенов, опсонизированных iC3b [93]. CR3 экспрессируется тромбоцитами, моноцитами, макрофагами, нейтрофилами, NK-клетками, эозинофилами, миелоидными клетками, фолликулярными дендритными клетками, CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками. CR4 экспрессируется тромбоцитами, моноцитами и макрофагами [8, 99, 100].

Рецепторы CRlg, экспрессируемые на макрофагах, могут связывать C3b и iC3b и тем самым вызывать фагоцитоз опсонизированных частиц и патогенов [101–103]. Этот рецептор может блокировать

активацию системы комплемента на мембранах макрофагов за счет ингибирования активности C3- и C5-конвертаз альтернативного пути [104].

Рецепторы C1qR и SIGNR1 (CD93 и CD209 соответственно) могут связывать молекулы C1q, связанные с мембраной клетки или частицы, и вызывать ее фагоцитоз. C1qR экспрессируется моноцитами и эндотелиальными клетками; SIGNR1 – дендритными и микроглиальными клетками [8, 105].

Анафилатоксины. Анафилатоксины C3a, C4a и C5a – это небольшие пептиды (10–14 кДа), которые, как упомянуто выше, непрерывно образуются в процессе активации системы комплемента и способны диффундировать от места активации. Они играют важную роль в процессе воспаления и активации клеток иммунитета, экспрессирующих рецепторы к ним. Имеется три основных рецептора к анафилатоксинам – C3aR, C5aR и C5aL2. Каждый из этих рецепторов в соответствии со своим названием может связываться или с C3a, или с C5a. Для анафилатоксина C4a рецептор неизвестен. Рецепторы C3aR экспрессируются нейтрофилами, эозинофилами, Т-клетками, тромбоцитами и антиген-презентирующими клетками. Рецепторы C5aR экспрессируются миелоидными клетками, моноцитами, дендритными клетками, антиген-презентирующими клетками, Т-клетками, эндотелиальными клетками, тромбоцитами и клетками почек. Рецептор C5aL2 экспрессируется макрофагами и нейтрофилами [8, 106].

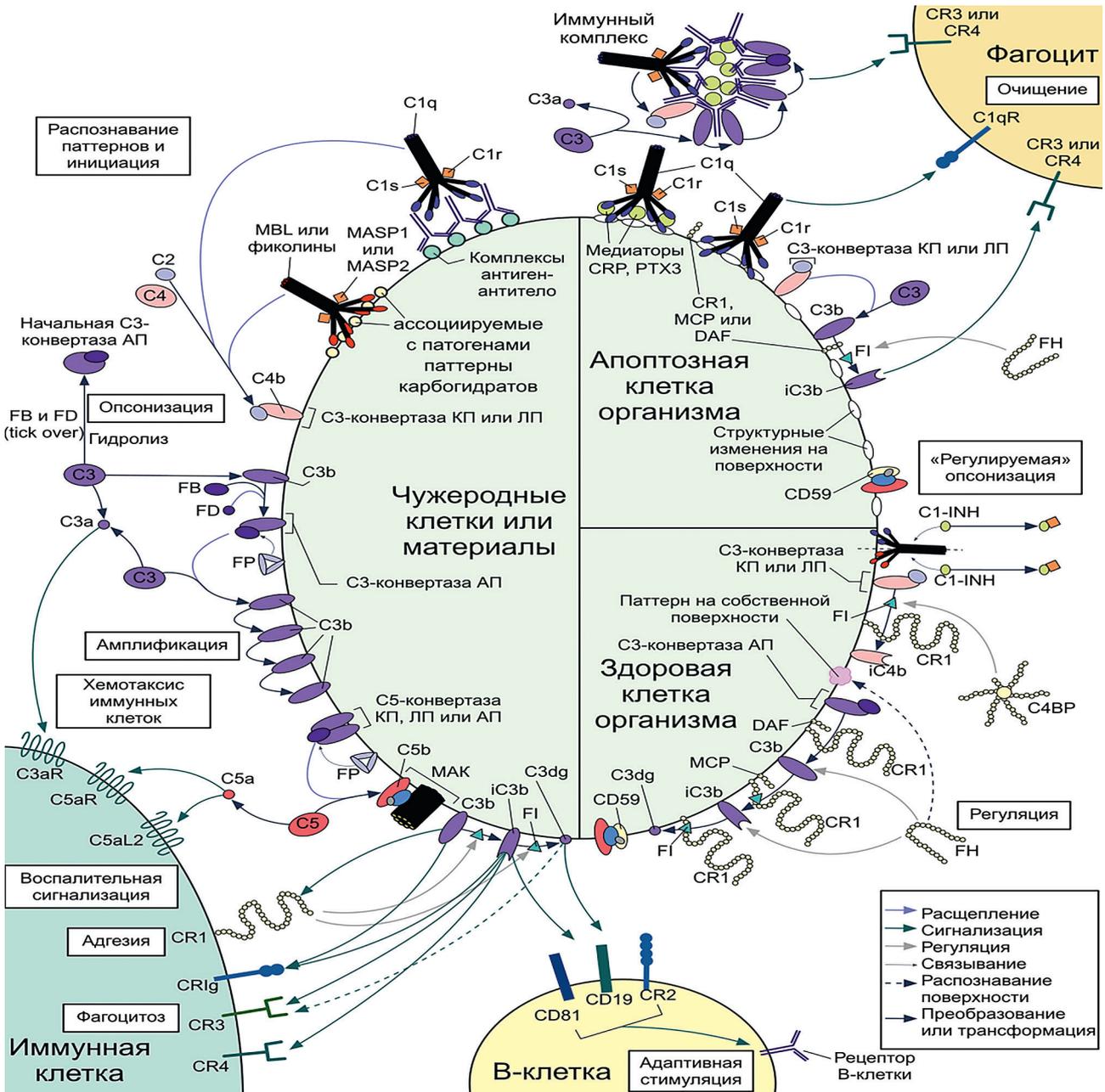
Самый активный из анафилатоксинов – C5a, а самый слабый – C4a. Анафилатоксины вызывают окислительный взрыв у макрофагов [107, 108], эозинофилов [109] и нейтрофилов [110, 111]. Кроме того, C3a и C5a индуцируют выработку гистамина базофилами [112, 113] и тучными клетками [114], а C5a может также активировать Т-клетки [115]. Считается, что C4a может активировать макрофаги и моноциты [116, 117]. Кроме того, есть данные о том, что анафилатоксин C3a может играть более сложную роль в воспалении, одновременно обладая про- и противовоспалительной активностью [118]. Так, например, миграция и дегрануляция нейтрофилов ингибируется в присутствии C3a.

В плазме человека анафилатоксины C3a и C5a преобразуются карбоксипептидазой N в C3a-desArg и C5a-desArg за счет гидролиза пептидной связи аминокислотного остатка аргинина на С-конце [119, 120]. Это приводит к тому, что провоспалительная активность этих анафилатоксинов значительно снижается [121, 122].

Роль системы комплемента в удалении измененных клеток организма. Система комплемента играет важную роль в удалении измененных клеток организма, например, апоптотических и некротических клеток и их частиц, поскольку белки системы

Рисунок 4

Механизмы активации и регуляции комплемента в физиологических условиях [28. с изменениями]



Когда комплемент встречается с чужеродной клеткой, молекулы распознавания C1q, манноза-связывающий лектин (MBL) и фиколины чувствуют кластеры антител или связанные с патогеном паттерны карбогидратов и активируют связанные с ними сериновые протеазы (C1r, C1s или MBL-связанные сериновые протеазы – MASP1 и MASP2), которые расщепляют C4 и C2 с образованием конвертазы C3 (C4bC2b) классического (КП) и лектинового путей (ЛП) на поверхности патогенной клетки. Кроме того, спонтанный гидролиз C3 приводит к генерации изначальных C3-конвертаз альтернативного пути (АП). Все C3-конвертазы расщепляют C3 на анафилактиксин C3a и C3b; последний опсонизирует клеточные мембраны и патогенные поверхности. Фактор В (FB) связывается с C3b и активируется фактором D (FD) для формирования конечных конвертаз АП (C3bFBb), которые превращают больше C3 в C3b, обеспечивая петлю положительной обратной связи. Увеличение плотности связанного C3b способствует образованию C5-конвертаз; он расщепляет C5 на анафилактиксин C5a и C5b, который после многоуровневого взаимодействия с C6–C9 и вставки в мембрану в свою очередь образует мембраноатакующий комплекс (МАК), что приводит к лизису, повреждению или активации клеток-мишеней. Высвобожденные анафилактиксыны действуют как иммунные медиаторы и привлекают первичные иммунные клетки, особенно в случае C5a. Взаимодействие опсонина C3b и продуктов его расщепления iC3b и C3dg с рецепторами комплемента клеток иммунитета (CR1–CR4, CR1g) обеспечивает клеточную адгезию (через CR1 (CD35) и/или фагоцитоз (через CR3, CR4 и CR1g)). Одновременно iC3b и C3dg модулируют адаптивные иммунные ответы, связываясь с рецептором CR2 В-клеток, тем самым снижая порог стимуляции В-клеток в 1000–10 000 раз. Фактор Р (FP) стабилизирует C3- и C5-конвертазы. На здоровых клетках активация комплемента строго контролируется. Ингибитор C1-INH регулирует активность комплексов распознавания, тогда как растворимые C4b-связывающий белок (C4BP), фактор Н (FH) и мембранные регуляторы белков активации комплемента (CR1, MCP и DAF) контролируют конвертазную активность за счет ускорения распада конвертаз и/или действуют как кофакторы для опосредуемого фактором I (FI) расщепления C3b и C4b. Наконец, CD59 предотвращает образование МАК. Удаление поврежденных и апоптотических клеток и иммунных комплексов достигается за счет распознавания структурных изменений на поверхности с помощью медиаторов, например, пентоксина 3. В дополнение к C3b/iC3b/C3dg, C1q также способствует удалению дебриса и иммунных комплексов, связываясь с рецепторами к C1q (C1qR и SIGNR1).

комплемента могут связываться с их поверхностями и помечать их [123–126]. Мембрана апоптотических клеток подвергается значительным изменениям, что приводит к потере мембранных регуляторов системы комплемента с их поверхности. Это вызывает активацию комплемента на их поверхности. С их поверхностью начинает связываться также комплекс C1 через C-реактивный белок, сывороточный амилоид P и пентраксин 3 [127]. Однако, поскольку фактор H тоже начинает адгезировать к поверхности апоптотических клеток, это позволяет запускать начальные этапы активации комплемента, но блокировать образование больших количеств C5-конвертаз, не вызывая воспаления [128, 129]. Таким образом, измененные клетки организма могут быть помечены с помощью C1q и iC3b, став маркером для фагоцитов [129, 130]. Нарушения в процессе опсонизации измененных клеток организма компонентами комплемента может приводить к накоплению клеточного дебриса, а собственные антигены могут затем служить аутоантигенами при аутоиммунных заболеваниях [131]. Схема физиологических функций системы комплемента приведена на *рисунке 4*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система комплемента – это сложный каскад взаимозависимых реакций, охваченных обратными связями, обеспечивающими как внешнюю защиту, так и утилитарные потребности организма, в котором на каждом «этаже», или уровне, имеются многочислен-

ные двусторонние функциональные связи с другими системами – от идейно близкой системы свертывания крови до целых органов, таких как почка или глаз [132].

Участие системы комплемента во множестве процессов, не относящихся, на первый взгляд, к непосредственной защите организма от бактериальной агрессии, требует от этой системы точной балансировки между уровнем активации, достаточным для защиты, с одной стороны, но не повреждающим собственные клетки – с другой. Этот баланс должен быть соблюден в любых условиях, невзирая на многочисленные полиморфизмы, которые «переполняют» эту систему и в крайних случаях приводят к ее разбалансировке и формированию разнообразных патологий и клинических проявлений.

Нет сомнений, что изучение системы комплемента принесет исследователям немало интересных и клинически востребованных результатов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ №19-02-00780 и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук (AAAA-A18-118012390250-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Ataullakhanov F.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3403-181X>

Литература

1. Cruse J.M., Lewis R.E. The Complement System. In: Cruse JM, Lewis RE, editors. Atlas of Immunology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 1999 [cited 2019 Feb 24]. p. 207–24. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-662-11196-3_11
2. Nonaka M. Evolution of the Complement System. In: Anderlueh G, Gilbert R, editors. MACPF/CDC Proteins – Agents of Defence, Attack and Invasion [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands 2014 [cited 2019 Feb 24]. p. 31–43. (Subcellular Biochemistry). Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8881-6_3
3. Lachmann P.J. Chapter 4 – The Amplification Loop of the Complement Pathways. In: Alt FW, editor. Advances in Immunology [Internet]. Academic Press 2009 [cited 2018 Feb 17]. p. 115–49. (Advances in Immunology; vol. 104). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065277608040042>
4. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. Nat Rev Immunol 2002 May; 2 (5): 346–53.
5. Murphy K., Weaver C. Janeway's immunobiology. 9th edition. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC; 2016. 904 p.
6. Holers V.M. Complement and its receptors: new insights into human disease. Annu Rev Immunol 2014; 32: 433–59.
7. Merle N.S., Church S.E., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina L.T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. Front Immunol [Internet] 2015 [cited 2018 Mar 27]; 6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00262/full>
8. Zipfel P.F., Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol 2009 Oct; 9 (10): 729–40.
9. Brodsky R.A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 2014 Oct 30; 124 (18): 2804–11.
10. Risitano A.M. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders. Immunobiology 2012 Nov 1; 217 (11): 1080–7.
11. Rother R.P., Rollins S.A., Mojciak C.F., Brodsky R.A., Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Nat

- Biotech 2007 Nov; 25(11): 1256–64.
12. Devalet B., Mullier F., Chatelain B., Dogné J.-M., Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol* 2015 Sep 1; 95 (3): 190–8.
 13. Kavanagh D., Goodship T.H., Richards A. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Semin Nephrol* 2013 Nov; 33 (6): 508–30.
 14. Pettigrew H.D., Teuber S.S., Gershwin M.E. Clinical Significance of Complement Deficiencies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1173 (1): 108–23.
 15. Trouw L.A., Pickering M.C., Blom A.M. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology* 2017 Sep; 13 (9): 538–47.
 16. Mortensen S.A., Sander B., Jensen R.K., Pedersen J.S., Golas M.M., Jensenius J.C., et al. Structure and activation of C1, the complex initiating the classical pathway of the complement cascade. *PNAS* 2017 Jan 31; 114 (5): 986–91.
 17. Gaboriaud C., Thielens N.M., Gregory L.A., Rossi V., Fontecilla-Camps J.C., Arlaud G.J. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol* 2004 Jul; 25 (7): 368–73.
 18. Duncan A.R., Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* 1988 Apr 21; 332 (6166): 738–40.
 19. Perkins S.J., Nealis A.S., Sutton B.J., Feinstein A. Solution structure of human and mouse immunoglobulin M by synchrotron X-ray scattering and molecular graphics modelling. A possible mechanism for complement activation. *J Mol Biol* 1991 Oct 20; 221 (4): 1345–66.
 20. Shulman M.J., Collins C., Pennell N., Hozumi N. Complement activation by IgM: evidence for the importance of the third constant domain of the mu heavy chain. *Eur J Immunol* 1987 Apr; 17 (4): 549–54.
 21. Chen F.H., Arya S.K., Rinfret A., Isenman D.E., Shulman M.J., Painter R.H. Domain-switched mouse IgM/IgG2b hybrids indicate individual roles for C mu 2, C mu 3, and C mu 4 domains in the regulation of the interaction of IgM with complement C1q. *J Immunol* 1997 Oct 1; 159 (7): 3354–63.
 22. Weiner E.M. On the Interaction of the First Complement Component C1 and its Subunit C1q with Solid-Phase IgM Immune Complexes. *Scandinavian Journal of Immunology* 1988; 28 (4): 425–30.
 23. Feinstein A., Richardson N.E., Gorick B.D., Hughes-Jones N.C. Immunoglobulin M Conformational Change is a Signal for Complement Activation. In: Celada F., Schumaker V.N., Sercarz E.E., ed. *Protein Conformation as an Immunological Signal* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1983 [cited 2019 Feb 24]. p. 47–57. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3778-2_6
 24. Diebold C.A., Beurskens F.J., de Jong R.N., Koning R.I., Strumane K., Lindorfer M.A., et al. Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science* 2014 Mar 14; 343 (6176): 1260–3.
 25. Wang G., de Jong R.N., van den Bremer E.T.J., Beurskens F.J., Labrijn A.F., Ugurlar D., et al. Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen. *Molecular Cell* 2016 Jul 7; 63 (1): 135–45.
 26. Claus D.R., Siegel J., Petras K., Osmand A.P., Gewurz H. Interactions of C-reactive protein with the first component of human complement. *J Immunol* 1977 Jul; 119 (1): 187–92.
 27. Almitairi J.O.M., Venkatraman Girija U., Furze C.M., Simpson-Gray X., Badakshi F., Marshall J.E., et al. Structure of the C1r-C1s interaction of the C1 complex of complement activation. *PNAS USA* 2018 Jan 23; 115 (4): 768–73.
 28. Ricklin D., Reis E.S., Lambris J.D. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat Rev Nephrol* 2016 Jul; 12 (7): 383–401.
 29. Gaboriaud C., Frachet P., Thielens N., Arlaud G. The Human C1q Globular Domain: Structure and Recognition of Non-Immune Self Ligands. *Front Immunol* [Internet] 2012 [cited 2018 Mar 27]; 2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2011.00092/full>
 30. Law S.K.A., Dodds A.W. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Science* 1997 Feb 1; 6 (2): 263–74.
 31. Campbell R.D., Dodds A.W., Porter R.R. The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. *Biochem J* 1980 Jul 1; 189 (1): 67–80.
 32. Vogt W., Hinsch B., Schmidt G., von Zabern I. Function of the activated fourth component of complement (C4b) in activation of C2. *FEBS Letters* 1982 Aug 2; 144 (2): 195–8.
 33. Fishelson Z., Müller-Eberhard H.J. C3 convertase of human complement: enhanced formation and stability of the enzyme generated with nickel instead of magnesium. *J Immunol* 1982 Dec 1; 129 (6): 2603–7.
 34. Rawal N., Pangburn M.K. Formation of High Affinity C5 Convertase of the Classical Pathway of Complement. *J Biol Chem* 2003 Oct 3; 278 (40): 38476–83.
 35. Sim R.B., Twose T.M., Paterson D.S., Sim E. The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem J* 1981 Jan 1; 193 (1): 115–27.
 36. Law S.K., Lichtenberg N.A., Levine R.P. Covalent binding and hemolytic activity of complement proteins. *PNAS* 1980 Dec 1; 77 (12): 7194–8.
 37. Law S.K., Lichtenberg N.A., Holcombe F.H., Levine R.P. Interaction between the labile binding sites of the fourth (C4) and fifth (C5) human complement proteins and erythrocyte cell membranes. *J Immunol* 1980 Aug 1; 125 (2): 634–9.
 38. Muller-Eberhard H.J. The Membrane Attack Complex of Complement. *Ann Rev Immunol* 1986; 4 (1): 503–28.
 39. Preissner K.T., Podack E.R., Müller-Eberhard H.J. The membrane attack complex of complement: relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7. *J Immunol* 1985 Jul; 135 (1): 445–51.
 40. Hadders M.A., Beringer D.X., Gros P. Structure of C8 α -MACPF Reveals Mechanism of Membrane Attack in Complement Immune Defense. *Science* 2007 Sep 14; 317 (5844): 1552–4.
 41. Serna M., Giles J.L., Morgan B.P., Bubeck D. Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nature Communications* 2016 Feb

- 4; 7: ncomms10587.
42. Sharp T.H., Koster A.J., Gros P. Heterogeneous MAC Initiator and Pore Structures in a Lipid Bilayer by Phase-Plate Cryo-electron Tomography. *Cell Reports* 2016 Apr 5; 15 (1): 1–8.
 43. Beltrame M.H., Catarino S.J., Goeldner I., Boldt A.B.W., de Messias-Reason I.J. The Lectin Pathway of Complement and Rheumatic Heart Disease. *Front Pediatr* [Internet]. 2015 [cited 2019 Feb 25]; 2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2014.00148/full>
 44. Héja D., Kocsis A., Dobó J., Szilágyi K., Szász R., Závodszy P., et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *PNAS USA* 2012 Jun 26; 109 (26): 10498–503.
 45. Degn S.E., Kjaer T.R., Kidmose R.T., Jensen L., Hansen A.G., Tekin M., et al. Complement activation by ligand-driven juxtaposition of discrete pattern recognition complexes. *PNAS USA* 2014 Sep 16; 111 (37): 13445–50.
 46. Pangburn M.K., Müller-Eberhard H.J. Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 421: 291–8.
 47. Pangburn M.K., Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 1981 Sep 1; 154 (3): 856–67.
 48. Isenman D.E., Kells D.I.C., Cooper N.R., Mueller-Eberhard H.J., Pangburn M.K. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry* 1981 Jul 1; 20 (15): 4458–67.
 49. Li K., Gor J., Perkins S.J. Self-association and domain rearrangements between complement C3 and C3u provide insight into the activation mechanism of C3. *Biochemical J* 2010 Oct 1; 431 (1): 63–72.
 50. Sim R.B., Laich A. Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 2000 Oct; 28 (5): 545–50.
 51. Pangburn M.K., Müller-Eberhard H.J. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J* 1986 May 1; 235 (3): 723–30.
 52. Rawal N., Pangburn M.K. Formation of High-Affinity C5 Convertases of the Alternative Pathway of Complement. *J Immunol* 2001 Feb 15; 166 (4): 2635–42.
 53. Ferreira V.P., Pangburn M.K., Cortés C. Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol* 2010 Aug; 47 (13): 2187–97.
 54. Kazatchkine M.D., Nydegger U.E. The human alternative complement pathway: biology and immunopathology of activation and regulation. *Prog Allergy* 1982; 30: 193–234.
 55. Pangburn M.K., Müller-Eberhard H.J. Complement C3 convertase: Cell surface restriction of β 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *PNAS USA* 1978 May; 75 (5): 2416–20.
 56. Blaum B.S., Hannan J.P., Herbert A.P., Kavanagh D., Uhrin D., Stehle T. Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nat Chem Biol* 2015 Jan; 11 (1): 77–82.
 57. Wu J., Wu Y.-Q., Ricklin D., Janssen B.J.C., Lambris J.D., Gros P. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol* 2009 Jul; 10 (7): 728–33.
 58. Kajander T., Lehtinen M.J., Hyvärinen S., Bhattacharjee A., Leung E., Isenman D.E., et al. Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host–nonhost discrimination by complement. *PNAS* 2011 Feb 15; 108 (7): 2897–902.
 59. Morgan H.P., Schmidt C.Q., Guariento M., Blaum B.S., Gillespie D., Herbert A.P., et al. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat Struct Mol Biol* 2011 Apr; 18 (4): 463–70.
 60. Kopp A., Hebecker M., Svobodová E., Józsi M. Factor H: A Complement Regulator in Health and Disease, and a Mediator of Cellular Interactions. *Biomolecules* 2012 Feb 7; 2 (1): 46–75.
 61. Berends E.T.M., Gorham R.D., Ruyken M., Soppe J.A., Orhan H., Aerts P.C., et al. Molecular insights into the surface-specific arrangement of complement C5 convertase enzymes. *BMC Biology* 2015; 13: 93.
 62. Jore M.M., Johnson S., Sheppard D., Barber N.M., Li Y.I., Nunn M.A., et al. Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nat Struct Mol Biol* 2016 May; 23 (5): 378–86.
 63. Fearon D.T., Austen K.F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 1975 Oct 1; 142 (4): 856–63.
 64. Kemper C., Atkinson J.P., Hourcade D.E. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Ann Rev Immunol* 2010; 28: 131–55.
 65. Spitzer D., Mitchell L.M., Atkinson J.P., Hourcade D.E. Properdin Can Initiate Complement Activation by Binding Specific Target Surfaces and Providing a Platform for De Novo Convertase Assembly. *J Immunol* 2007 Aug 15; 179 (4): 2600–8.
 66. Harboe M., Mollnes T.E. The alternative complement pathway revisited. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008 Aug 1; 12 (4): 1074–84.
 67. Hill A., DeZern A.E., Kinoshita T., Brodsky R.A. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature Reviews Disease Primers* 2017 May 18; 3: nrdp201728.
 68. Jokiranta T.S. HUS and atypical HUS. *Blood* 2017 May 25; 129 (21): 2847–56.
 69. Sim R.B., Arlaud G.J., Colomb M.G. Kinetics of reaction of human C1-inhibitor with the human complement system proteases C1r and C1s. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Enzymology* 1980 Apr 11; 612 (2): 433–49.
 70. Nilsson T., Wiman B. Kinetics of the Reaction between Human C1-Esterase Inhibitor and C1r or C1s. *Eur J Biochemistry* 1983 Jan 1; 129 (3): 663–7.
 71. Davis A.E., Lu F., Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2010 Nov; 104 (5): 886–93.
 72. Ziccardi R.J. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of

- the first component of human complement. *J Immunol* 1982 Jun 1; 128 (6): 2505–8.
73. Paréj K., Dobó J., Závodszy P., Gál P. The control of the complement lectin pathway activation revisited: both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while α 2-macroglobulin is not. *Mol Immunol* 2013 Jul; 54 (3–4): 415–22.
 74. Presanis J.S., Hajela K., Ambrus G., Gál P., Sim R.B. Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol* 2004 Feb; 40 (13): 921–9.
 75. Blom A.M., Zadura A.F., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. Positively charged amino acids at the interface between α -chain CCP1 and CCP2 of C4BP are required for regulation of the classical C3-convertase. *Mol Immunol* 2000 Jun 1; 37 (8): 445–53.
 76. Ziccardi R.J., Dahlback B., Müller-Eberhard H.J. Characterization of the interaction of human C4b-binding protein with physiological ligands. *J Biol Chem* 1984 Nov 25; 259 (22): 13674–9.
 77. Roversi P., Johnson S., Caesar J.J.E., McLean F., Leath K.J., Tsiptsoglou S.A., et al. Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *PNAS* 2011 Aug 2; 108 (31): 12839–44.
 78. Pangburn M.K., Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *Journal of Experimental Medicine* 1977 Jul 1; 146 (1): 257–70.
 79. Lambris J.D., Lao Z., Oglesby T.J., Atkinson J.P., Hack C.E., Becherer J.D. Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J Immunol* 1996 Jun 15; 156 (12): 4821–32.
 80. Blom A.M., Webb J., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. A Cluster of Positively Charged Amino Acids in the C4BP α -Chain Is Crucial for C4b Binding and Factor I Cofactor Function. *J Biol Chem* 1999 Jul 2; 274 (27): 19237–45.
 81. Blom A.M., Kask L., Dahlbäck B. Structural Requirements for the Complement Regulatory Activities of C4BP. *J Biol Chem* 2001 Jul 20; 276 (29): 27136–44.
 82. Blom A.M., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. Mutations in alpha-chain of C4BP that selectively affect its factor I cofactor function. *J Biol Chem* 2003 Oct 31; 278 (44): 43437–42.
 83. Nicholson-Weller A., Wang C.E. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med* 1994 Apr; 123(4): 485–91.
 84. Hourcade D.E., Mitchell L., Kuttner-Kondo L.A., Atkinson J.P., Medof M.E. Decay-accelerating Factor (DAF), Complement Receptor 1 (CR1), and Factor H Dissociate the Complement AP C3 Convertase (C3bBb) via Sites on the Type A Domain of Bb. *J Biol Chem* 2002 Jan 11; 277 (2): 1107–12.
 85. Fujita T., Inoue T., Ogawa K., Iida K., Tamura N. The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. *Journal of Experimental Medicine* 1987 Nov 1; 166 (5): 1221–8.
 86. Maciejewski J.P., Young N.S., Yu.M., Anderson S.M., Sloand E.M. Analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins on platelets from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Thrombosis Research* 1996 Sep 15; 83 (6): 433–47.
 87. Meri S., Morgan B.P., Davies A., Daniels R.H., Olavesen M.G., Waldmann H., et al. Human protectin (CD59), an 18,000–20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunol* 1990 Sep; 71 (1): 1–9.
 88. Morgan B.P. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiology* 2016 Jun 1; 221 (6): 747–51.
 89. Huang Y., Qiao F., Abagyan R., Hazard S., Tomlinson S. Defining the CD59-C9 binding interaction. *J Biol Chem* 2006 Sep 15; 281 (37): 27398–404.
 90. Liszewski M.K., Post T.W., Atkinson J.P. Membrane Cofactor Protein (MCP or CD46): Newest Member of the Regulators of Complement Activation Gene Cluster. *Annu Rev Immunol* 1991; 9 (1): 431–55.
 91. Barilla-LaBarca M.L., Liszewski M.K., Lambris J.D., Hourcade D., Atkinson J.P. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol* 2002 Jun 15; 168 (12): 6298–304.
 92. Smith B.O., Mallin R.L., Krych-Goldberg M., Wang X., Hauhart R.E., Bromek K., et al. Structure of the C3b Binding Site of CR1 (CD35), the Immune Adherence Receptor. *Cell* 2002 Mar 22; 108 (6): 769–80.
 93. Underhill D.M., Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825–52.
 94. Zewde N., Jr R.D.G., Dorado A., Morikis D. Quantitative Modeling of the Alternative Pathway of the Complement System. *PLOS ONE* 2016 Mar 31; 11 (3): e0152337.
 95. Pangburn M.K., Rawal N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochemical Society Transactions* 2002 Nov 1; 30 (6): 1006–10.
 96. Dempsey P.W., Allison M.E., Akkaraju S., Goodnow C.C., Fearon D.T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996 Jan 19; 271 (5247): 348–50.
 97. Isaák A., Prechl J., Gergely J., Erdei A. The role of CR2 in autoimmunity. *Autoimmunity* 2006 Aug; 39 (5): 357–66.
 98. Roozendaal R., Carroll M.C. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev* 2007 Oct; 219: 157–66.
 99. Vik D.P., Fearon D.T. Cellular distribution of complement receptor type 4 (CR4): expression on human platelets. *J Immunol* 1987 Jan 1; 138 (1): 254–8.
 100. Cosgrove L.J., d'Apice A.J., Haddad A., Pedersen J., McKenzie I.F. CR3 receptor on platelets and its role in the prostaglandin metabolic pathway. *Immunol Cell Biol* 1987 Dec; 65 (Pt 6): 453–60.
 101. He J.Q., Wiesmann C., van Lookeren Campagne M. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. *Mol Immunol* 2008 Oct; 45 (16): 4041–7.
 102. Gorgani N.N., He J.Q., Katschke K.J., Helmy K.Y., Xi H., Steffek M., et al. Complement receptor of the Ig superfamily enhances complement-mediated phagocytosis in a subpopulation of tissue resident macrophages. *J Immunol*

- 2008 Dec 1; 181 (11): 7902–8.
103. Helmy K.Y., Katschke K.J., Gorgani N.N., Kljavin N.M., Elliott J.M., Diehl L., et al. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 2006 Mar 10; 124 (5): 915–27.
 104. Wiesmann C., Katschke K.J., Yin J., Helmy K.Y., Steffek M., Fairbrother W.J., et al. Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation. *Nature* 2006 Nov 9; 444 (7116): 217–20.
 105. Fonseca M.I., Carpenter P.M., Park M., Palmarini G., Nelson E.L., Tenner A.J. C1qR(P), a myeloid cell receptor in blood, is predominantly expressed on endothelial cells in human tissue. *J Leukoc Biol* 2001 Nov; 70 (5): 793–800.
 106. Arbesu I., Bucsaiova M., Fischer M.B., Mannhalter C. Platelet-borne complement proteins and their role in platelet–bacteria interactions. *J Thromb Haemost* 2016 Nov; 14 (11): 2241–52.
 107. Aksamit R.R., Falk W., Leonard E.J. Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. *J Immunol* 1981 Jun; 126 (6): 2194–9.
 108. Murakami Y., Imamichi T., Nagasawa S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology* 1993 Aug; 79 (4): 633–8.
 109. Elsner J., Oppermann M., Czech W., Dobos G., Schöpf E., Norgauer J., et al. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur J Immunol* 1994 Mar; 24 (3): 518–22.
 110. Ehrenguber M.U., Geiser T., Deranleau D.A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett* 1994 Jun 13; 346 (2–3): 181–4.
 111. Elsner J., Oppermann M., Czech W., Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood* 1994 Jun 1; 83 (11): 3324–31.
 112. Kretzschmar T., Jeromin A., Gietz C., Bautsch W., Klos A., Köhl J., et al. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur J Immunol* 1993 Feb; 23 (2): 558–61.
 113. Lett-Brown M.A., Leonard E.J. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. *J Immunol* 1977 Mar; 118 (3): 815–8.
 114. el-Lati S.G., Dahinden C.A., Church M.K. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol* 1994 May; 102 (5): 803–6.
 115. Nataf S., Davoust N., Ames R.S., Barnum S.R. Human T-cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J Immunol* 1999 Apr 1; 162 (7): 4018–23.
 116. Zhao Y., Xu H., Yu W., Xie B.-D. Complement anaphylatoxin C4a inhibits C5a-induced neointima formation following arterial injury. *Mol Med Rep* 2014 Jul; 10 (1): 45–52.
 117. Tsuruta T., Yamamoto T., Matsubara S., Nagasawa S., Tanase S., Tanaka J., et al. Novel function of C4a anaphylatoxin. Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis. *Am J Pathol* 1993 Jun; 142 (6): 1848–57.
 118. Coulthard L.G., Woodruff T.M. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. *J Immunol* 2015 Apr 15; 194 (8): 3542–8.
 119. Matthews K.W., Mueller-Ortiz S.L., Wetzel R.A. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol* 2004 Jan; 40 (11): 785–93.
 120. Mueller-Ortiz S.L., Wang D., Morales J.E., Li L., Chang J.-Y., Wetzel R.A. Targeted disruption of the gene encoding the murine small subunit of carboxypeptidase N (CPN1) causes susceptibility to C5a anaphylatoxin-mediated shock. *J Immunol* 2009 May 15; 182 (10): 6533–9.
 121. Bajic G., Yatime L., Klos A., Andersen G.R. Human C3a and C3a desArg anaphylatoxins have conserved structures, in contrast to C5a and C5a desArg. *Protein Sci* 2013 Feb; 22 (2): 204–12.
 122. Sayah S., Jauneau A.C., Patte C., Tonon M.C., Vaudry H., Fontaine M. Two different transduction pathways are activated by C3a and C5a anaphylatoxins on astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 2003 Apr 10; 112 (1–2): 53–60.
 123. Flierman R., Daha M.R. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology* 2007; 212 (4–5): 363–70.
 124. Trouw L.A., Blom A.M., Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol* 2008 Mar 1; 45 (5): 1199–207.
 125. Kemper C., Mitchell L.M., Zhang L., Hourcade D.E. The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. *PNAS USA* 2008 Jul 1; 105 (26): 9023–8.
 126. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V.A., Cook H.T., Andrews M., Carroll M.C., et al. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med* 2000 Aug 7; 192 (3): 359–66.
 127. Nauta A.J., Daha M.R., van Kooten C., Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunology* 2003 Mar 1; 24(3): 148–54.
 128. Gershov D., Kim S., Brot N., Elkon K.B. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2000 Nov 6; 192 (9): 1353–64.
 129. Mihlan M., Stippa S., Józsi M., Zipfel P.F. Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H. *Cell Death Differ* 2009 Dec; 16 (12): 1630–40.
 130. Cook H.T., Botto M. Mechanisms of Disease: the complement system and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006 Jun; 2 (6): 330–7.
 131. Carroll M.C. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Immunol* 2004 Oct; 4 (10): 825–31.
 132. Botto M., Kirschfink M., Macor P., Pickering M.C., Würzner R., Tedesco F. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 2009 Sep; 46 (14): 2774–83.

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-145-153

Актуальность и методы коррекции вторичной гипогаммаглобулинемии в клинической практике

Д.Н. Балашов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Современные протоколы терапии многих онкологических, гематологических и некоторых наследственных заболеваний могут приводить к развитию тяжелой вторичной гипогаммаглобулинемии. В частности, причиной ее нередко становятся терапия моноклональными антителами к В-клеткам (ритуксимаб, белимумаб, инотузумаб) и ингибиторами тирозинкиназ (иматиниб, дезатиниб), а также применение целого ряда иммуносупрессивных и химиотерапевтических агентов (глюкокортикостероидов, азатиоприна, циклофосфида и др.). При хроническом лимфолейкозе и множественной миеломе причиной гипогаммаглобулинемии может быть не только специфическая терапия, но и некоторые особенности самих заболеваний. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток также приводит к развитию тяжелой и длительной гипогаммаглобулинемии. Это ассоциировано как с проводимой интенсивной иммуно-/миелоаблативной терапией, так и с особенностями иммунологической реконституции после проведенного лечения. Современные препараты внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) обладают широким репертуаром патоген-специфической активности при достаточно высоком профиле безопасности и являются неотъемлемой частью сопроводительной терапии пациентов с вторичной гипогаммаглобулинемией. В работе представлен обзор литературных данных о применении ВВИГ в различных клинических ситуациях, а также несколько клинических примеров из собственного опыта.

Ключевые слова: вторичная гипогаммаглобулинемия, внутривенные иммуноглобулины, хронический лимфолейкоз, множественная миелома, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, заместительная терапия

Балашов Д.Н. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 145–153.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-145-153

Relevance and management of secondary hypogammaglobulinemia in clinical practice

D.N. Balashov

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Advance protocols for the treatment most of oncology, hematology and some inherited disorders may lead to development severe secondary hypogammaglobulinaemia. Particularly, it is often caused by therapy with monoclonal antibodies binding B-cells (such as rituximab, belimumab, inotuzumab), therapy with inhibitors of tyrosine-kinase (imatinib, dasatinib), as well as applying a variety of immunosuppressive and chemotherapy agents (steroids, azathioprine, cyclophosphamide etc.). It should be noted, that chronic lymphoid leukemia and multiple myeloma could be complicated with hypogammaglobulinaemia, not only because of specific therapy, but also as features of the diseases. Hematopoietic stem cells transplantation can also lead to development severe and prolonged hypogammaglobulinaemia. This is associated with intensive immune/myeloablative therapy, as well as with immunologic reconstitution after transplantation. Modern intravenous immunoglobulins (IVIg) have a wide repertoire of pathogen-specific activity with high safety profile and constitute essential part of therapy patients with secondary hypogammaglobulinaemia. The paper presents literature review of IVIg usage in various clinical situations, as well as several clinical examples of personal experience.

Key words: secondary hypogammaglobulinemia, intravenous immunoglobulin, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, hematopoietic stem cell transplantation, replacement therapy

Balashov D.N. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2019; 18 (3): 145–153.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-145-153

© 2019 НМИЦ ДГОИ
Поступила 23.07.2019
Принята к печати 29.08.2019

Контактная информация:

Балашов Дмитрий Николаевич,
д-р мед. наук, заведующий отделением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток № 2, врач-гематолог, НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: bala8@yandex.ru

© 2019 by NMRC PHOI
Received 23.07.2019
Accepted 29.08.2019

Correspondence:

Dmitri N. Balashov, PhD, Head of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Department #2, Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: bala8@yandex.ru

Гипогаммаглобулинемия – один из хорошо известных факторов риска развития инфекции. В 1951 году заместительная терапия препаратом иммуноглобулинов была впервые использована *Огденом Брутоном* с заместительной целью у пациента с агаммаглобулинемией; в течение почти 70 лет такая терапия широко применяется у паци-

ентов с первичными иммунодефицитами (ПИД) [1]. Именно в этой группе пациентов связь между уровнем IgG и риском развития инфекций описана неоднократно [2, 3]. Однако, помимо ПИД, существует ряд клинических ситуаций, при которых тяжелая гипогаммаглобулинемия становится серьезной проблемой, ассоциированной либо с особенностями

основного заболевания, либо является следствием проведенного лечения. В таких ситуациях речь идет о вторичных иммунодефицитах (ВИД), причем их количество на современном этапе развития медицины существенно превышает число пациентов с ПИД.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ). Инфекционные осложнения – причина почти 50% летальных исходов, ассоциированных с ХЛЛ [4]. Этиология этой проблемы мультифакторная и связана как с иммунным дефектом, ассоциированным с заболеванием, так и с проводимой химиотерапией или иммунотерапией [5]. Гипогаммаглобулинемия в этой группе пациентов – самый распространенный иммунный дефект (20–70% случаев), который часто коррелирует с продолжительностью и тяжестью заболевания [6] и обычно необратим даже у пациентов, достигших полной ремиссии.

Основные рандомизированные исследования, направленные на оценку эффективности заместительных трансфузий препаратов внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) у пациентов с ХЛЛ, выполнены 20–30 лет назад. Недавний анализ полученных ранее результатов, свидетельствует о том, что использование ВВИГ оправдано у пациентов с ХЛЛ, осложненным гипогаммаглобулинемией, с рецидивирующими инфекциями. Так, ВВИГ достоверно снижал количество инфекционных эпизодов, уменьшал потребность в антибактериальных препаратах, значительно редуцировал количество дней госпитализации [7]. Однако показатель выживаемости не отличался в исследовательской и контрольной группах. В связи с этим сформулированы следующие рекомендации по проведению заместительной терапии ВВИГ у пациентов с ХЛЛ: наличие рецидивирующих инфекций является аргументом для использования ВВИГ при уровне IgG в сыворотке крови < 500 мг/дл; режим дозирования предполагает назначение ВВИГ в дозе 400 мг/кг, 1 раз в 3–4 нед., для достижения уровня IgG 600–800 мг/дл [4, 8]. Существует мнение о том, что не только скрининг уровня IgG, но и верификация уровней отдельных субклассов IgG может дать ответ на вопрос о риске развития тех или иных инфекционных осложнений [9].

Множественная миелома (ММ). Инфекции – причина заболеваемости и наиболее частая причина смертности пациентов с ММ [10]. Кроме того, следует учитывать, что новые терапевтические опции ведут к трансформации ММ в хроническое состояние, а значит, к периодическим рецидивам и необходимости проведения специфической терапии, увеличивая кумулятивный иммуносупрессивный профиль, а соответственно и риск инфекций. Частота и тяжесть инфекционных эпизодов различна в разных фазах заболевания ММ: они выше в активной фазе и в первые месяцы индукционной терапии [11]. На ранних

стадиях ММ чаще отмечают инфекции респираторного тракта, в том числе *H. influenzae* и *S. pneumoniae*, предполагающие роль гипогаммаглобулинемии в их патогенезе. Так же как при ХЛЛ, существуют только несколько исследований, в которых изучали роль заместительной терапии ВВИГ у пациентов. *H.M. Chapel и соавт.* [12] в 1994 году продемонстрировали протективную роль ВВИГ против тяжелых жизнеугрожающих инфекций, а также снижение риска повторных инфекций у 82 пациентов с ММ в двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании. Аналогичные результаты опубликованы в двух других исследованиях [7].

Ятрогенная гипогаммаглобулинемия. Причиной вторичного ВИД нередко становятся терапия моноклональными антителами к В-клеткам (ритуксимаб, белимумаб, инотузумаб), терапия ингибиторами тирозинкиназ (иматиниб, дезатиниб), а также применение целого ряда иммуносупрессивных и химиотерапевтических агентов (глюкокортикостероидов, азатиоприна, циклофосфамида и др.).

Ритуксимаб, представляющий собой моноклональные антитела к CD20, – один из наиболее используемых препаратов, приводящих к ятрогенной гипогаммаглобулинемии. Его активно используют для лечения многих опухолевых заболеваний, а также рефрактерных и плохо контролируемых аутоиммунных или воспалительных заболеваний. Удаление CD20-экспрессирующих клеточных популяций приводит к дисрегуляции иммунного гомеостаза [13, 14]. Гипогаммаглобулинемия – наиболее частое последствие этого процесса [15–20]. *T. Kelesidis и соавт.* [21] опубликовали данные о влиянии ритуксимаба на развитие гипогаммаглобулинемии, в частности, продемонстрировано, что риск развития у пациентов данного осложнения был выше при онкологических заболеваниях, чем при аутоиммунных патологиях. Однако авторы признают неоднозначность такого анализа в связи с целым рядом сопутствующих факторов, которые мешают объективному сравнению (химиотерапия, нейтропения, сопутствующие осложнения и др.). При гематологических заболеваниях частота ритуксимаб-индуцированной гипогаммаглобулинемии колеблется от 15 до 40% [22]. В ряде исследований продемонстрировано, что принадлежность к женскому полу, использование флударабина и аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – это значимые дополнительные факторы риска [23–25]. Существует также гипотеза о том, что риск развития гипогаммаглобулинемии и инфекций, по-видимому, связан с некоторыми аутоиммунными осложнениями. Например, пациенты с ревматоидным артритом или иммунной тромбоцитопенией хорошо переносят лечение без значительного риска инфекций и гипогаммаглобулинемии [26–28].

Одна из важных составляющих мониторинга и контроля тяжести ВИД, индуцированного ритуксимабом, – оценка уровня IgG перед его использованием и на протяжении как минимум 6 мес. после введения последней дозы. Более длительный период наблюдения целесообразен у пациентов с низким уровнем иммуноглобулинов до начала терапии ритуксимабом, а также при наличии у пациента дополнительных факторов риска.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. ТГСК – неотъемлемая часть современных протоколов терапии широкого спектра гематологических, онкологических и наследственных патологий. Вне зависимости от особенностей основного заболевания проведение ТГСК всегда сопровождается развитием ВИД, обусловленного проведением интенсивной подготовительной иммуно-/миелоаблативной терапии (кондиционирования), а также посттрансплантационной иммуносупрессией и особенностями реконституции иммунной системы после проведенного лечения. Именно поэтому инфекционные осложнения – одна из важнейших причин высокого уровня заболеваемости и смертности после ТГСК.

Помимо эрадикации опухолевых клеток у пациентов со злокачественными новообразованиями, задачи стандартного кондиционирования включают удаление плюрипотентных гемопоэтических предшественников для создания «вакантных пространств» в костном мозге и внескостномозговых депо для приживления донорских клеток, а также иммуноаблативную терапию, необходимую для предотвращения острого отторжения трансплантата. Именно поэтому одним из эффектов кондиционирования является деплеция лимфоцитов и долгоживущих плазматических клеток, играющих первоочередную роль в создании клеточного и гуморального иммунологического барьера. Регенерация этих популяций клеток занимает довольно длительное время, что усугубляет и пролонгирует период ВИД, определяя иммунологическую некомпетентность пациента.

Отдельные субпопуляции лимфоцитов восстанавливаются достаточно долго. В первую очередь происходит восстановление механизмов врожденного иммунитета, затем запускаются механизмы реконституции адаптивного ответа – этот процесс может продолжаться от 6–12 мес. до нескольких лет, особенно если речь идет о необходимости длительной профилактики и лечения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ).

Относительное содержание В-лимфоцитов восстанавливается приблизительно через 3 мес., однако нормальное абсолютное их количество, как правило, определяется только через 6–12 мес. после ТГСК [29–31]. Большинство В-клеток при этом представлено в основном наивными субпопуляция-

ми; восстановление В-клеток «памяти» происходит существенно позже [32, 33]. В первые месяцы после трансплантации В-лимфоциты характеризуются низкими пролиферативным и дифференцировочным ответами на антигенспецифические факторы, что свидетельствует об их функциональной незрелости [34]. На восстановление их потенциала уходит от нескольких месяцев до нескольких лет [35, 36]. В-лимфоциты с переключаемым изотипом, способные продуцировать IgG, появляются лишь через 3–6 мес. после ТГСК, однако синтез специфических IgG может быть отсрочен до 1–2 лет после трансплантации [29, 31]. Динамика восстановления подклассов IgG различна: уровни IgG1 и IgG3 нормализуются в течение первого года после ТГСК, а восстановление IgG2 и IgG4 отсрочено до 1,5–2 лет [37]. Именно пролонгированным дефицитом IgG2 можно объяснить восприимчивость реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) к поздним бактериальным инфекциям. Дефицит выработки иммуноглобулинов еще более выражен у пациентов с РТПХ и пациентов, получавших антиtimoцитарный глобулин или анти-CD52 моноклональные антитела в кондиционировании [31, 38]. Функциональная незрелость донорских лимфоцитов и значительное снижение синтеза иммуноглобулинов лежат в основе нарушения иммунного ответа против вирусов и некоторых представителей бактериальной флоры.

Реконституция Т-клеток после ТГСК имеет двухфазную последовательность. В первой, тимус-независимой фазе, происходит антиген-стимулированная периферическая экспансия Т-лимфоцитов, трансфузированных пациенту с трансплантатом, соответственно, репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR) в этой популяции ограничен. Удаление Т-лимфоцитов из трансплантата, что нередко используется при альтернативной ТГСК, лишает пациента шанса на тимус-независимую фазу иммунорекогнитуции. Во второй, тимус-зависимой фазе, происходит экспансия наивных Т-клеток из донорских стволовых клеток, что приводит к появлению широкого репертуара TCR [39, 40]. К сожалению, в связи с ТГСК-обусловленным нарушением тимопоэза процесс тимус-зависимой реконституции может оставаться неполноценным в течение многих лет [39]. Нарушение реконституции Т-клеточного звена иммунитета, безусловно, влияет на способность В-клеток расширять репертуар специфических иммуноглобулинов, поэтому даже нормализацию уровня IgG в крови у пациента до появления способности к воспроизводству наивного пула Т-клеток нельзя считать полноценным восстановлением иммунного потенциала и исключать необходимость проведения заместительных трансфузий препаратами ВВИГ.

Таким образом, реципиент ГСК – один из классических примеров пациента с тяжелым ВИД и гипо-

гаммаглобулинемией; потребность в применении препаратов поливалентных ВВИГ у такого пациента обоснована, особенно в первые месяцы после ТГСК. Тем не менее результаты исследований, направленных на изучение эффективности ВВИГ в этой когорте, не всегда выглядят однозначно и часто становятся предметом дискуссии. В ранних работах профилактическое введение поливалентного ВВИГ было практически убикивтарным, этой стратегии придерживалось большинство трансплантационных центров. Результаты отдельных клинических исследований демонстрировали снижение частоты инфекционных осложнений, а также уменьшение риска появления интерстициальных пневмоний и частоты развития острой РТПХ; некоторые исследовательские группы показали также увеличение общей выживаемости [41–45]. С течением времени подход к профилактическому введению ВВИГ изменился, предметом для обсуждения стали различные стратегические варианты их применения. Данная ситуация связана в первую очередь с изменением арсенала противомикробных препаратов, появлением новых диагностических и терапевтических опций, направленных на раннюю диагностику и терапию инфекций. В крупнейшем метаанализе результатов профилактического использования ВВИГ у пациентов после ТГСК, выполненном *P. Raanani* и соавт. [45], продемонстрировано отсутствие положительного влияния на общую летальность пациентов, инфекционную смертность, а также частоту развития РТПХ у пациентов с различными заболеваниями после ТГСК. Несмотря на высокую статистическую достоверность полученных данных, этот анализ имеет ряд спорных моментов. В частности, большинство включенных в исследование пациентов были трансплантированы от родственного HLA-совместимого донора, то есть имели потенциально лучший прогноз по сравнению с реципиентами альтернативного трансплантата. Кроме того, не учитывалась возможность модификации клеточных характеристик трансплантата с использованием развивающихся методов иммуномагнитной селекции либо с применением моноклональных антител (анти-CD20+, анти-CD52+ и др.), потенциально влияющих на глубину и длительность ВИД [46, 47]. С другой стороны, не был принят во внимание возраст трансплантированных пациентов, который также способен оказать влияние на кинетику восстановления иммунологической компетенции [48].

Важная роль препаратов ВВИГ в протоколах ТГСК по-прежнему декларируется различными руководствами, при этом остается ряд вопросов, требующих изучения с учетом современных подходов к ТГСК. С точки зрения полноты научной информации, наиболее изучена проблема использования ВВИГ

для профилактики цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ). Частота ЦМВ-ассоциированных осложнений у реципиентов ГСК достигает 10–15%, при этом вероятность неблагоприятных исходов при развитии тяжелых висцеральных проблем колеблется от 50 до 90% [49]. Впервые выводы об эффективности препаратов поливалентных иммуноглобулинов для профилактики ЦМВ-инфекции после родственной аллогенной ТГСК были сделаны *D.J. Winston* и соавт. [50, 51], которые продемонстрировали, что реактивация ЦМВ-инфекции реже встречалась в группе пациентов, получавших ВВИГ.

J. Graham-Pole и соавт. [52] также опубликовали статистически обоснованные результаты об эффективности ВВИГ в исследовании с участием 50 пациентов, 29 из которых получали ВВИГ с профилактической целью; в 21 случае ВВИГ не использовали. Помимо редукции частоты развития ЦМВ-инфекции, назначение поливалентного ВВИГ достоверно снижало риск всех форм тяжелых вирусных, бактериальных и грибковых инфекций, что в свою очередь приводило к увеличению общей выживаемости.

Результаты одного из крупных контролируемых рандомизированных исследований с включением 382 пациентов опубликовали *K. Sullivan* и соавт. [41]. В исследуемой группе ВВИГ назначали в дозе 500 мг/кг, еженедельно, до +90-го дня, затем ежемесячно, до +360-го дня после ТГСК; в контрольной группе препараты ВВИГ не использовали. Были получены статистически подтвержденные данные о снижении частоты развития ЦМВ-пневмоний в группе пациентов с ВВИГ по сравнению с контрольной группой (13 и 22% соответственно; $p = 0,021$). Интересно, что частота развития грамнегативного сепсиса и локальных инфекций в исследуемой группе также оказалась достоверно ниже, чем в контрольной группе. Однако в 2001 году *C. Cordonnier* и соавт. [53] не удалось воспроизвести аналогичные результаты в плацебо-контролируемом двойном слепом рандомизированном исследовании в группе из 179 пациентов после родственной ТГСК.

Одно из последних исследований, ориентированных на изучение эффективности ВВИГ для профилактики ЦМВ-инфекции после ТГСК, опубликовано *G. Goldstein* и соавт. [54]. Рандомизацию проводили в группе пациентов, получающих препараты ВВИГ в дозе 500 мг/кг, 1 раз в нед. до +100-го дня; затем 1 раз в мес. до +360-го дня без оценки уровня IgG в сыворотке крови, а также в контрольной группе, где препараты ВВИГ назначали только при снижении уровня IgG < 700 мг/дл. Кумулятивная вероятность ЦМВ-инфекции через год после трансплантации оказалась достоверно ниже у пациентов, получавших ВВИГ регулярно без контроля уровня IgG (44,4 и 13,4% соответственно; $p = 0,001$)

Так как ЦМВ-пневмония – одно из наиболее грозных вирусных осложнений у реципиентов ГСК, применение высоких доз ВВИГ в составе комплексной терапии не для профилактики, а для лечения данного осложнения можно считать одним из наиболее обоснованных показаний. В работах *P. Ljungman* и соавт. [55], *E. Gluckman* и соавт. [49] были получены данные об увеличении выживаемости пациентов с ЦМВ-пневмонией при использовании ВВИГ совместно с противовирусными препаратами, в том числе впервые продемонстрирована эффективность ВВИГ в дозах, достигающих 2–3 г/кг [49].

В целом проблема профилактики и лечения большинства вирусных инфекций после ТГСК чрезвычайно серьезна. Панель противовирусных препаратов ограничена сегодня в первую очередь специфическими противогерпетическими вирусостатиками. Широкий спектр вирусных инфекций, представляющих потенциальную опасность для пациента после ТГСК, диктует необходимость принятия альтернативных мер для их профилактики и лечения.

Некоторые респираторные вирусы также являются одной из частых причин тяжелых осложнений и летальности после ТГСК [56]. Среди них особого внимания заслуживают респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, вирусы парагриппа и гриппа, которые становятся причиной жизнеугрожающих и даже фатальных поражений легких после ТГСК. Несмотря на то что частота их встречаемости невысока, летальность от пневмоний, ассоциированных с этими вирусами, достигает 45% [56]. К числу тяжелых инфекций, играющих важную роль в заболеваемости пациентов после ТГСК, относят также аденовирус (с широким диапазоном висцеральной патологии), парвовирус (нередкая причина тяжелых дисфункций трансплантата) и широкую панель вирусов кишечной группы (триггеров развития интерстициальной формы острой РТПХ).

Профилактика и лечение инфекционных осложнений – это не единственная мишень для поливалентных ВВИГ после ТГСК. Их иммуномодулирующий эффект, в частности, снижение риска возникновения тяжелой РТПХ, анализировали в нескольких клинических исследованиях. По данным *K. Sullivan* и соавт. [41], назначение препаратов ВВИГ приводило к снижению вероятности развития тяжелой острой РТПХ с 51 до 34% ($p = 0,0051$), а также уменьшало летальность, ассоциированную с трансплантацией ($p = 0,023$) после HLA-идентичной ТГСК. *C. Cordonnier* и соавт. [53] опубликовали данные об эффективности влияния различных доз ВВИГ на контроль РТПХ. В группах пациентов, получавших ВВИГ в дозах 50; 250 и 500 мг/кг, наименьшая вероятность развития острой РТПХ (≥ 2 -й стадии) была зарегистрирована при максимальной дозе препарата у пациентов,

трансплантированных от HLA-совместимого сиблинга. Однако преимуществ по показателю общей выживаемости не продемонстрировано, в первую очередь в связи с более высокой частотой веноокклюзионной болезни у пациентов, получавших высокие дозы препарата.

Несмотря на то, что рекомендации по профилактическому применению ВВИГ базируются на результатах исследований, проведенных более 15–20 лет назад, их актуальность по-прежнему высока. Согласно стандартным подходам использование препаратов поливалентных ВВИГ необходимо как для контроля инфекций, так и для профилактики РТПХ после ТГСК, включая иммуномодулирующий эффект. Стандарты использования ВВИГ предполагают дозы, не превышающие 500 мг/кг, 1–2 раза в нед. на протяжении первых 3 мес., затем 1 раз в нед., ежемесячно, до 360-го дня после ТГСК [57].

Не следует забывать, что фармакокинетика препаратов ВВИГ у пациентов после ТГСК и пациентов других групп может отличаться. Период полувыведения препаратов поливалентных IgG составляет в среднем 22 дня, однако, по данным *K.H. Rand* и соавт. [58], у пациентов после ТГСК этот срок может сократиться до 6 дней, что является причиной повышенного белкового катаболизма, обусловленного медикаментозной токсичностью, инфекциями, РТПХ и т.д. Тяжелый соматический статус пациента после ТГСК – повод для более частого мониторинга уровня IgG, необходимого для своевременного начала заместительной терапии.

Современные тенденции развития ТГСК способствуют усугублению продолжительности и тяжести ВИД, ассоциированных с более частым применением неродственных и гаплоидентичных доноров, использованием препаратов с высоким миело- и иммуноаблативным потенциалом, применением методов клеточного инжиниринга трансплантата с полной и частичной лимфодеплецией. Технология ТГСК перешла сегодня на принципиально иной уровень, демонстрирующий большую эффективность для лечения большого спектра заболеваний, возможность использования альтернативных доноров без увеличения риска РТПХ, высокоэффективный контроль многих аллоиммунных осложнений. Тем не менее существующий вектор развития повышает актуальность проблемы ВИД в посттрансплантационном периоде. Именно поэтому все более значимую роль в структуре заболеваемости и смертности после ТГСК играют инфекционные осложнения. Отсутствие клинических исследований по оценке эффективности препаратов поливалентных иммуноглобулинов в период развития технологии ТГСК – веский аргумент для актуализации этого вопроса, появление доказательной базы будет способствовать коррекции режимов и правил дозирования препаратов ВВИГ [59].

Опыт использования ВВИГ после ТГСК в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

Основой внутреннего алгоритма использования ВВИГ являются стандартные рекомендации: заместительные трансфузии ВВИГ после ТГСК проводятся в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева из расчета 0,5 г/кг массы тела пациента при снижении уровня IgG < 400 мг/дл. Данный подход предполагает регулярный мониторинг уровня IgG с кратностью 1 раз в 2 нед. до +100 дня, затем 1 раз в мес. до нормализации синтеза IgG. Наличие у пациента тяжелых осложнений, следствием которых становится либо высокий белковый катаболизм, либо вероятные потери через поврежденные слизистые мембраны, является основанием для более частого мониторинга.

Алгоритмы профилактики инфекций с использованием ВВИГ отработаны и основаны на статистических данных, но лечебный эффект данной группы препаратов до настоящего времени оценивали лишь в единичных клинических наблюдениях. К сожалению, получение доказательной базы лечебного эффекта ВВИГ – практически невыполнимая задача, учитывая тяжесть многих висцеральных инфекций и отсутствие возможности формирования контрольной группы в ситуации, представляющей потенциальную угрозу здоровью и даже жизни пациента.

На сегодняшний день в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева наличие у пациента тяжелой вирусной висцеральной инфекции – это повод для назначения ВВИГ в дозе 2 г/кг, либо в виде разовой дозы (с интервалом в 10–14 дней), либо фракционно – 0,4 г/кг в течение 5 дней (с тем же интервалом в 10–14 дней).

Наличие у пациента тяжелой герпетической инфекции, например, ЦМВ-пневмонии, подразумевает мобилизацию всех возможных терапевтических опций, имеющих потенциальный куративный эффект. Один из клинических примеров: пациент А., 3 года, с диагнозом «синдром Вискотта–Олдрича», перенесший ТГСК от неродственного донора с селективной Т-деплецией трансплантата. Были проведены заместительные трансфузии ВВИГ и стандартная профилактика ацикловиrom, но на +30-е сутки после ТГСК у ребенка появился ЦМВ в крови (95 коп./мл), в связи с чем была начата терапия фоскарнетом (на фоне гипофункции трансплантата), а также терапия Т-клеточным препаратом (CD45RA-), потенциально имеющим широкую патогенспецифичность. Несмотря на это, вирусная нагрузка выросла до 17900 коп./мл за 3 нед., появились признаки дыхательной недостаточности. По данным компьютерной томографии (КТ), было отмечено развитие интерстициальной пневмонии; ее ЦМВ-этиология подтверждена результатами бронхоскопии и верификации ЦМВ (16700 коп./мл в лаважной жидкости). В связи с развитием описанной выше клинической картины была произведена сме-

на вирусостатика на сидофовир и начата терапия ВВИГ – Привиджен (CSL Behring AG) в дозе 2 г/кг, 2 введения с интервалом в 14 дней. На фоне проводимой терапии в состоянии пациента отмечена положительная динамика; при контрольном КТ – редукция интерстициальных изменений, что коррелировало со значительным уменьшением вирусной нагрузки.

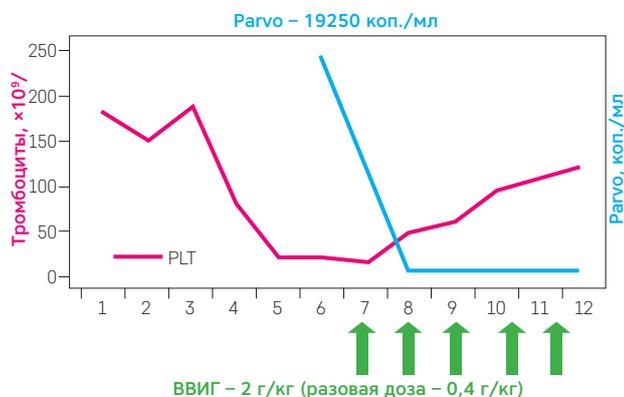
Мы описали клиническую ситуацию, при которой мобилизация всего арсенала терапевтических опций (клеточная терапия, ВВИГ, вирусостатическая химиотерапия) абсолютно аргументирована жизнеугрожающим состоянием пациента. Вклад каждого компонента в терапевтический эффект оценить сложно, однако в аналогичной ситуации он не должен подвергаться сомнению.

Если против герпетической группы существуют специфические вирусостатические препараты, то в отношении ряда других вирусов такой возможности на сегодняшний день не существует. В частности, парвовирус В19 у пациентов после ТГСК может стать причиной тяжелой дисфункции трансплантата. В связи с тем что ВИД у реципиента ГСК является чрезвычайно серьезной проблемой, а формирование приобретенного патоген-специфического иммунитета может быть отсрочено на многие месяцы, проявления парвовирусной инфекции могут быть клинически значимы и иметь неблагоприятные последствия. Единственным возможным вариантом терапии может быть использование ВВИГ, учитывая вероятное наличие в препарате специфических к парвовирусу IgG.

Пациенту Б., 18 лет, с диагнозом «острый миелобластный лейкоз» была выполнена аллогенная ТГСК от гаплоидентичного донора с приживлением в регламентированные сроки и хорошей функцией трансплантата. Состояние пациента осложнилось развитием острой, а затем хронической РТПХ с поражением кожи и слизистых, в связи с чем он длительно получал комбинированную иммуносупрессивную терапию, в том числе терапию глюкокортикостероидами. Через 10 мес. от ТГСК было отмечено развитие гипорегенераторной анемии (Hb – 82 г/л; ретикулоциты – 0,16%), а затем тромбоцитопении (до $21 \times 10^9/\text{л}$) и лейкопении (до $0,45 \times 10^9/\text{л}$). С целью верификации диагноза была выполнена костномозговая пункция: по основному заболеванию подтверждена ремиссия. Однако при проведении вирусологической диагностики субстрата костного мозга методом ПЦР обнаружен парвовирус В19 в количестве 19250 коп./мл, в связи с чем пациенту был проведен курс терапии ВВИГ (Привиджен, CSL Behring AG) в дозе 0,4 г/кг/сут в течение 5 дней (суммарная доза – 2 г/кг). Эффект в отношении тромбоцитарного компартмента был отмечен уже после первых двух доз ВВИГ (см. рисунок); по окончании 5-дневного курса зарегистриро-

Рисунок

Эффективность ВВИГ у пациента с парвовирусной инфекцией после ТГСК: синяя кривая – вирусная нагрузка (макс. – 19250 коп./мл) с последующей редукцией после начала терапии; красная кривая – уровень тромбоцитов; нормализация после второй дозы ВВИГ



вали также значительное увеличение гемоглобина и лейкоцитарной клеточной линии.

В данном клиническом случае мы продемонстрировали эффективность высоких доз ВВИГ при инфекции, вызванной парвовирусом В19, у пациента с хронической РТПХ, получающего иммуносупрессивную терапию, а значит, не имеющего перспектив на специфическую иммунореконституцию в ближайший от осложнения период времени. Привиджен (CSL Behring AG), который применяли в данном случае, – это современный поливалентный ВВИГ с широким спектром активности благодаря значительному пулу доноров, плазма которых используется для производства каждой единицы препарата. Важно отметить, что наличие в этом препарате ряда специфических антител, в том числе IgG к парвовирусу В19, заявлено производителем [60]. Целесообразность использования эскалированных доз препарата была аргументирована необходимостью создания достаточной для терапевтического эффекта концентрации IgG к парвовирусу В19 у пациента с клинически значимой инфекцией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты лечения многих онкологических, гематологических и наследственных заболеваний с каждым годом улучшаются. Тем не менее ВИД остается серьезной проблемой, которая может значительно ухудшить прогноз у потенциально курбельного пациента. Широкий спектр противомикробных препаратов, используемых в качестве упреждающей или направленной терапии, – безусловно, важный компонент лечения. Тем не менее терапевтический потенциал большинства из них может сопровождаться дополнительной висцеральной токсичностью, непредсказуемой интерактивностью с другими агентами, а также высокой вероятностью развития лекарственной резистентности. Преимущества современных препаратов поливалентных ВВИГ обусловлены широким репертуаром патогенспецифической активности при достаточно высоком профиле безопасности. Значимость современных препаратов ВВИГ и оптимизация их использования не могут подвергаться сомнению, однако в ряде случаев требуется обновление имеющихся знаний для отработки режимов их использования в контексте меняющихся технологий лечения основного заболевания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья написана при финансовой поддержке компании CSL Behring AG (Швейцария).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>

Литература

1. Bruton O.C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952 Jun; 9 (6): 722–8.
2. Furst D.E. Serum immunoglobulins and risk of infection: how low can you go? *Semin Arthritis Rheum* 2009 Aug; 39 (1): 18–29.
3. Orange J.S., Grossman W.J., Navickis R.J., Wilkes M.M. Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical studies. *Clin Immunol* 2010 Oct; 137 (1): 21–30.
4. Oscier D., Dearden C., Eren E., Erem E., Fegan C., Follows G., et al. Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012; 159: 541–64.
5. Ravandi F., O'Brien S. Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2006 Feb; 55 (2): 197–209.
6. Morrison V.A. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010 Mar; 23 (1): 145–53.
7. Raanani P., Gafter-Gvili A., Paul M., Ben-Bassat I., Leibovici L., Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in hematological malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev* 2008 Oct; 8 (4): CD006501
8. Orange J.S., Hossny E.M., Weiler C.R., Ballow M., Berger M., Bonilla F.A., et al. Use of intravenous immunoglobulin in

- human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2006 Apr; 117 (4 Suppl): S525–53.
9. Freeman J.A., Crassini K.R., Best O.G., Forsyth C.J., Mackinlay N.J., Han P., et al. Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013 Jan; 54 (1): 99–104.
 10. Nucci M., Anaissie E. Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents. *Clin Infect Dis* 2009 Oct 15; 49 (8): 1211–25.
 11. Ludwig H., Zojer N. Supportive care in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007 Dec; 20 (4): 817–35.
 12. Chapel H.M., Lee M., Hargreaves R., Pamphilon D.H., Prentice A.G. Randomised trial of intravenous immunoglobulin as prophylaxis against infection in plateau-phase multiple myeloma. *The UK Group for Immunoglobulin Replacement Therapy in Multiple Myeloma. Lancet* 1994; 343 (8905): 1059–63.
 13. Avivi I., Stroopinsky D., Katz T. Anti-CD20 monoclonal antibodies: beyond B-cells. *Blood Rev* 2013; 27 (5): 217–23.
 14. Kano G., Nakatani T., Yagi K., Sakamoto I., Imamura T. Complicated pathophysiology behind rituximab-induced persistent hypogammaglobulinemia. *Immunol Lett* (2014) 159(1–2):76–8.
 15. Cooper N., Davies E.G., Thrasher A.J. Repeated courses of rituximab for autoimmune cytopenias may precipitate profound hypogammaglobulinaemia requiring replacement intravenous immunoglobulin. *Br J Haematol* (2009) 146(1): 120–2.
 16. De La Torre I., Leandro M.J., Valor L., Becerra E., Edwards J.C., Cambridge G. Total serum immunoglobulin levels in patients with RA after multiple B-cell depletion cycles based on rituximab: relationship with B-cell kinetics. *Rheumatology* 2012; 51 (5): 833–40.
 17. Levy R., Mahevas M., Galicier L., Boutboul D., Moroch J., Loustau V., et al. Profound symptomatic hypogammaglobulinemia: a rare late complication after rituximab treatment for immune thrombocytopenia. Report of 3 cases and systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 2014; 13 (10): 1055–63.
 18. Makatsori M., Kiani-Alikhan S., Manson A.L., Verma N., Leandro M., Gurugama N.P., et al. Hypogammaglobulinaemia after rituximab treatment-incidence and outcomes. *QJM* 2014; 107 (10): 821–8.
 19. Miles S.A., McGratten M. Persistent pan-hypogammaglobulinemia after CHOP-rituximab for HIV-related lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23 (1): 247–8.
 20. Nishio M., Endo T., Fujimoto K., Sato N., Sakai T., Obara M., et al. Persistent pan-hypogammaglobulinemia with selected loss of memory B cells and impaired isotype expression after rituximab therapy for post-transplant EBV-associated autoimmune hemolytic anemia. *Eur J Haematol* 2005; 75 (6): 527–9.
 21. Kelesidis T., Daikos G., Boumpas D., Tsiodras S. Does rituximab increase the incidence of infectious complications? A narrative review. *Int J Infect Dis* 2011; 15 (1): e2–1.
 22. Casulo C., Maragulia J., Zelenetz A.D. Incidence of hypogammaglobulinemia in patients receiving rituximab and the use of intravenous immunoglobulin for recurrent infections. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13 (2):106–11.
 23. Cabanillas F., Liboy I., Pavia O., Rivera E. High incidence of non-neutropenic infections induced by rituximab plus fludarabine and associated with hypogammaglobulinemia: a frequently unrecognized and easily treatable complication. *Ann Oncol* 2006; 17 (9): 1424–7.
 24. Imashuku S., Teramura T., Morimoto A., Naya M., Kuroda H. Prolonged hypogammaglobulinemia following rituximab treatment for post transplant Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33 (1): 129–30.
 25. Lim S.H., Zhang Y., Wang Z., Esler W.V., Beggs D., Pruitt B., et al. Maintenance rituximab after autologous stem cell transplant for high-risk B-cell lymphoma induces prolonged and severe hypogammaglobulinemia. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35(2): 207–8.
 26. van Vollenhoven R.F., Emery P., Bingham C.O. III, Keystone E.C., Fleischmann R.M., Furst D.E., et al. Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 (9): 1496–502.
 27. Zaja F., Volpetti S., Chiozzotto M., Puglisi S., Isola M., Buttignol S., et al. Long-term follow-up analysis after rituximab salvage therapy in adult patients with immune thrombocytopenia. *Am J Hematol* 2012; 87 (9): 886–9.
 28. Arnold D.M., Dentali F., Crowther M.A., Meyer R.M., Cook R.J., Sigouin C., et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2007; 146 (1): 25–33.
 29. Storek J., Dawson M.A., Storer B., Stevens-Ayers T., Maloney D.G., Marr K.A., et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 3380–9.
 30. Storek J., Ferrara S., Ku N., Giorgi J.V., Champlin R.E., Saxon A. B-cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 387–98.
 31. Small T.N., Keever C.A., Weiner-Fedus S., Heller G., O'Reilly R.J., Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 1990; 76: 1647–56.
 32. Burns D.M., Tierney R., Shannon-Lowe C., Croudace J., Inman C., Abbotts B., et al. Memory B-cell reconstitution following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation is an EBV-associated transformation event. *Blood* 2015; 126 (25): 2665–75.
 33. Marie-Cardine A., Divay F., Dutot I., Green A., Perdrix A., Boyer O., et al. Transitional B-cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 2008; 127: 14–25.
 34. Matsue K., Lum L.G., Witherspoon R.P., Storb R. Proliferative and differentiative responses of B cells from human marrow graft recipients to T-cell-derived factors.

- Blood 1987; 69: 308–15.
35. Saliba R.M., Rezvani K., Leen A., Jorgensen J., Shah N., Hosing C., et al. General and virus-specific immune cell reconstitution after double cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (7): 1284–90.
 36. Maury S., Mary J.Y., Rabian C., Schwarzingler M., Toubert A., Scieux C., et al. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br J Haematol* 2001; 115: 630–41.
 37. Matsue K., Lum L.G., Witherspoon R.P., Storb R. Proliferative and differentiative responses of B cells from human marrow graft recipients to T-cell-derived factors. *Blood* 1987; 69: 308–15.
 38. Velardi A., Cucciaioni S., Terenzi A., Quinti I., Aversa F., Grossi C.E., et al. Acquisition of Ig isotype diversity after bone marrow transplantation in adults. A recapitulation of normal B-cell ontogeny. *J Immunol* 1988; 141: 815–20.
 39. Ringhoffer S., Rojewski M., Dohner H., Bunjes D., Ringhoffer M. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/betaTREC ratio and thymic naive T-cells. *Haematologica* 2013; 98: 1600–8.
 40. Mackall C.L., Hakim F.T., Gress R.E. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 1997; 18: 245–51.
 41. Sullivan K.M., Kopecky K.J., Jocom J., Fisher L., Buckner C.D., Meyers J.D., et al. Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1990; 323: 705–12.
 42. Bass E.B., Powe N.R., Goodman S.N., Graziano S.L., Griffiths R.I., Kickler T.S., Wingard J.R. Efficacy of immune globulin in preventing complications of bone marrow transplantation: a metaanalysis. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 273–82.
 43. Wolff S.N., Fay J.W., Herzig R.H., Greer J.P., Dummer S., Brown R.A., et al. High-dose weekly intravenous immunoglobulin to prevent infections in patients undergoing autologous bone marrow transplantation or severe myelosuppressive therapy: A study of the American Bone Marrow Transplant Group. *Ann Intern Med* 1993; 118: 937–42.
 44. Winston D.J., Antin J.H., Wolff S.N., Bierer B.E., Small T., Miller K.B., et al. A multicenter, randomized, double-blind comparison of different doses of intravenous immunoglobulin for prevention of graft-versus-host disease and infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 187–96.
 45. Raanani P., Gafter-Gvili A., Paul M., Ben-Bassat I., Leibovici L., Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2009; 27: 770–81.
 46. Buser A., Stern M., Arber C., Medinger M., Halter J., Rovo A., et al. Impaired B-cell reconstitution in lymphoma patients undergoing allogeneic HSCT: an effect of pretreatment with rituximab? *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 483–7.
 47. Schmidt-Hieber M., Schwarck S., Stro-ux A., Ganepola S., Reinke P., Thiel E., et al. Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of *in vivo* T-cell depletion. *Int J Hematol* 2010; 91: 877–85.
 48. Kalwak K., Górczyńska E., Toporski J., Turkiewicz D., Słociak M., Ussowicz M., et al. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *Br J Haematol* 2002; 118: 74–89.
 49. Gluckman E., Traineau R., Devergie A., Esperou-Bourdeau H., Hirsch I. Prevention and treatment of CMV infection after allogeneic bone marrow transplant. *Ann Hematol* 1992; 64 (suppl): A158–161.
 50. Winston D.J., Ho W.G., Lin C.H., Bartoni K., Budinger M.D., Gale R.P., Champlin R.E. Intravenous immune globulin for prevention of cytomegalovirus infection and interstitial pneumonia after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1987; 106: 12–8.
 51. Winston D.J., Ho W.G., Lin C.H., Budinger M.D., Champlin R.E., Gale R.P. Intravenous immunoglobulin for modification of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. Preliminary results of a controlled trial. *Am J Med* 1984; 76: 128–33.
 52. Graham-Pole J., Camitta B., Casper J., Eifenbein G., Gross S., Herzig R., et al. Intravenous immunoglobulin may lessen all forms of infection in patients receiving allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: A pediatric oncology group study. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3: 559–66.
 53. Cordonnier C., Chevret S., Legrand M., Rafi H., Dhédin N., Lehmann B., et al. Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Ann Intern Med* 2003; 139: 8–18.
 54. Goldstein G., Rutenberg T.F., Mendelovich S.L., Hutt D., Oikawa M.T., Toren A., Bielora B. The role of immunoglobulin prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Pediatr Blood Cancer* 2017 Jul; 64 (7). DOI: 10.1002/pbc.26420
 55. Ljungman P., Engelhard D., Link H., Biron P., Brandt L., Brunet S., et al. Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 831–5.
 56. Boeckh M. The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2008 Nov; 143 (4): 455–67.
 57. Tomblyn M., Chiller T., Einsele H., Gress R., Sepkowitz K., Storek J., et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Blood Marrow Transplant* 2009 Oct; 15 (10): 1143–238.
 58. Rand K.H., Gibbs K., Derendorf H., Graham-Pole J. Pharmacokinetics of Intravenous Immunoglobulin (Gammagard) in Bone Marrow Transplant Patients. *J Clin Pharmacology* 1991; 31: 1151–54.
 59. Cowan J., Cameron D.W., Knoll G., Tay J. Protocol for updating a systematic review of randomised controlled trials on the prophylactic use of intravenous immunoglobulin for patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *BMJ Open* 2015 Aug 21; 5 (8): e008316. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-008316
 60. Data on file. CSL Behring

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме). Все страницы пронумерованы.

Шрифт – *Times New Roman*, 14 пунктов, через 1,5 интервала.

2. На 1-й странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждений, в которых выполнена работа, их полный адрес с указанием индекса.

Статью должны подписать все авторы; в конце статьи укажите их контактные телефоны, рабочий адрес с индексом, электронную почту; Автор, с которым редакция будет вести переписку: фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание.

3. Объем статей: оригинальная статья – не более 12 стр.; описание отдельных наблюдений, заметки из практики – не более 5 стр.; обзор литературы – не более 20 стр.; краткие сообщения и письма в редакцию – 3 стр.

Структура оригинальной статьи: введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статье должно быть приложено **подробное резюме на русском и английском языках**: название статьи, фамилии и инициалами авторов, название учреждений, содержание работы; **для оригинальных статей – структурированное резюме** (введение, материалы и методы, результаты исследования, выводы). Объем резюме – до 1500 знаков с пробелами; количество ключевых слов – до 10.

4. Иллюстративный материал:

- фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими;

- фотографии представляются в оригинале или электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм);

- графики, схемы и рисунки – в формате EPS.Adobe Illustrator 7.0–10.0.

- Все рисунки должны быть пронумерованы; **подписи к рисункам – на русском и английском языках** на отдельном листе. На рисунке указывают «верх» и «низ»; фрагменты рисунка обозначают строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи.

- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название **на русском и английском языках**; все сокращения расшифрованы в примечании к таблице;

- ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы приводятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках, а их расположение автор указывает в квадрате на полях статьи слева.

5. Единицы измерений – в СИ. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование необщепринятых сокращений не допускается.

Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы:

- список ссылок приводится в порядке цитирования; все источники пронумерованы, их нумерация должна строго соответствовать нумерации в тексте статьи; ссылки на неопубликованные работы не допускаются;

- для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если их более 6, указывают первые 6 авторов, далее «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте);

- при ссылке на статьи из журналов указывают также название статьи; название журнала, год, том, номер выпуска, страницы;

- при ссылке на монографии указывают полное название книги, место издания, издательство, год издания;

- при ссылке на авторефераты диссертаций указывают полное название работы, докторская или кандидатская, год и место издания;

- при ссылке на данные, полученные из Интернета, указывают электронный адрес цитируемого источника;

- все ссылки на литературные источники печатают арабскими цифрами в квадратных скобках, например [5];

- количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 20–25 источников, в обзорах литературы – не более 60.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати бесплатно, в порядке общей очереди.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

Авторы могут присылать свои материалы по электронной почте: journal@fnkc.

Бланк подписки по каталогу «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать»

Абонемент		на журнал	<input type="text" value="12914"/>		(индекс издания)		Количество комплектов:		<input type="text"/>										
(наименование издания)																			
на 2020 год по месяцам:																			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12								
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>								
Куда				(почтовый индекс)								(адрес)							
Кому												(фамилия, инициалы)							
Доставочная карточка		на журнал	<input type="text" value="12914"/>		(индекс издания)		Количество комплектов:		<input type="text"/>										
(наименование издания)																			
Стоимость	подписки доставки	руб. коп.		руб. коп.		Количество комплектов:		<input type="text"/>											
на 2020 год по месяцам:																			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12								
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>								
Куда				(почтовый индекс)								(адрес)							
Кому												(фамилия, инициалы)							

МИКАМИН®

единственный

эхинокандин, зарегистрированный для профилактики кандидоза при ТГСК или у больных, у которых предполагается нейтропения (<500/мкл) в течение 10 дней и более.*,¹⁻³



МИКАМИН®
микафунгин

АО «Астеллас Фарма»
Россия, 109147, Москва,
ул. Марксистская, 16.
Тел.: +7 (495) 737-07-56

1. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Микамин® ЛСП-009005/09 от 10.11.2009
2. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Кансидас® П N014909/01-10.11.2009
3. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Эраксис® ЛП-001066-14.08.15
Информация для специалистов здравоохранения с распространением на специализированных мероприятиях.
Перед применением препарата Микамин® ознакомьтесь с инструкцией по медицинскому применению (доступна на www.grls.rosminzdrav.ru).
Номер регистрационного удостоверения ЛСП-009005/09 от 10.11.2009

* Единственный зарегистрированный в РФ по данным www.grls.rosminzdrav.ru по состоянию на апрель 2019.

** У пациентов после аллогенной трансплантации кроветворных стволовых клеток или больных, у которых предполагается нейтропения (количество нейтрофилов < 500/мкл) в течение 10 дней и более

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ, ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ НЕОБХОДИМО ОЗНАКОМИТЬСЯ С ИНСТРУКЦИЕЙ

Реклама