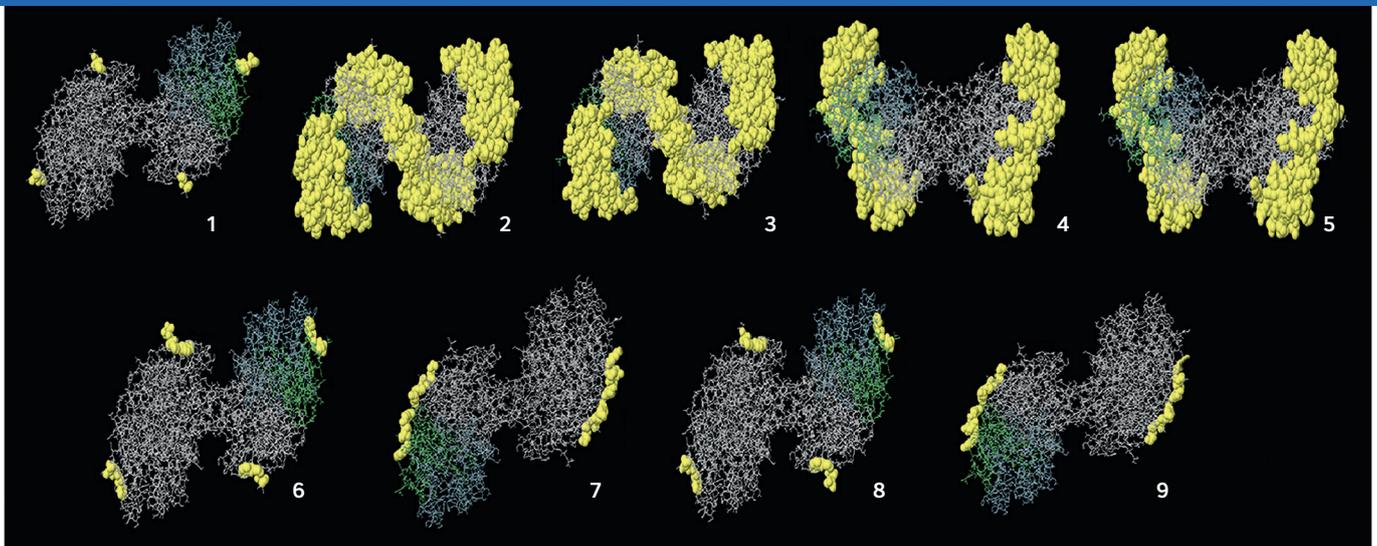


Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии

№ 1 | 19 | 2020

Научно-практический журнал



3D Representation of the predicted discontinuous epitopes asparaginase protein of *Lupinus luteus*, page 40

9

Результаты терапии детей с острым миелоидным лейкозом и инициальным гиперлейкоцитозом по протоколу ОМЛ-ММ-2006

The results of treatment in children with AML and initial hyperleucocytosis according to the AML-MM-2006 Protocol

47

Опыт применения препарата брентуксимаб ведотин в лечении детей и молодых взрослых с первично-рефрактерным течением и рецидивами лимфомы Ходжкина

The experience of using the Brentuximab vedotin in the treatment of children and young adults with primary refractory course and relapses of Hodgkin's lymphoma

158

Рекомендации 2020 года по диагностике и терапии инвазивного аспергиллеза у детей с онкогематологическими заболеваниями

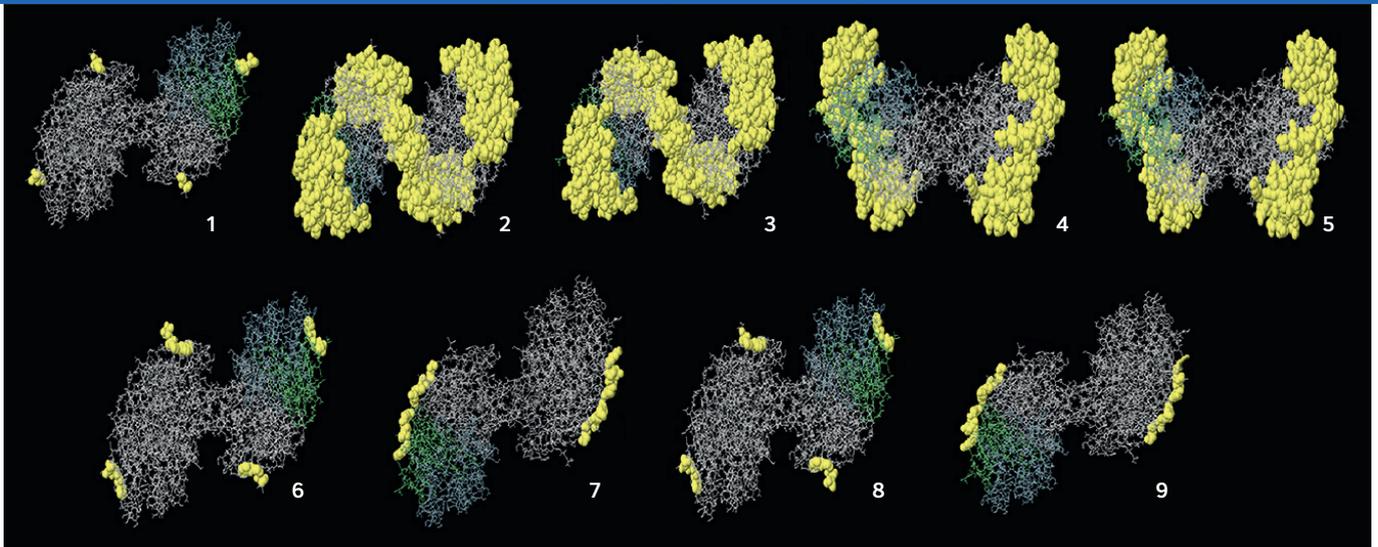
Updated 2020 guidelines for diagnosis and treatment of invasive aspergillosis in children with hematologic malignancy



Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology

№ 1 | 19 | 2020

scientific and practical journal



3D Representation of the predicted discontinuous epitopes asparaginases protein of *Lupinus luteus*, page 40

9

The results of treatment in children with AML and initial hyperleucocytosis according to the AML-MM-2006 Protocol

47

The experience of using the Brentuximab vedotin in the treatment of children and young adults with primary refractory course and relapses of Hodgkin's lymphoma

158

Updated 2020 guidelines for diagnosis and treatment of invasive children with hematologic malignancy



НАУКА —
ДЕТЯМ



A peer-reviewed open-access journal, is published 4 times a year at www.HemOncIm.ru by the Foundation for support and development of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology «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 © 2020 by «Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology» («D. Rogachev NMRCPHO»), 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 поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – детям» и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 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# Ознакомиться 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:

© 2020 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России). 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 and Immunology» Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow («D. Rogachev NMRCPHO»).

Foundation for support and development of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology «Science – for children's benefit».

Publisher

Foundation for support and development of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology «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

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России).

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

Издатель

Фонд поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «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

№ 1 | том 19 | 2020



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.
доктор 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. Romyantsev
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. Romyantsev
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, DSc, 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

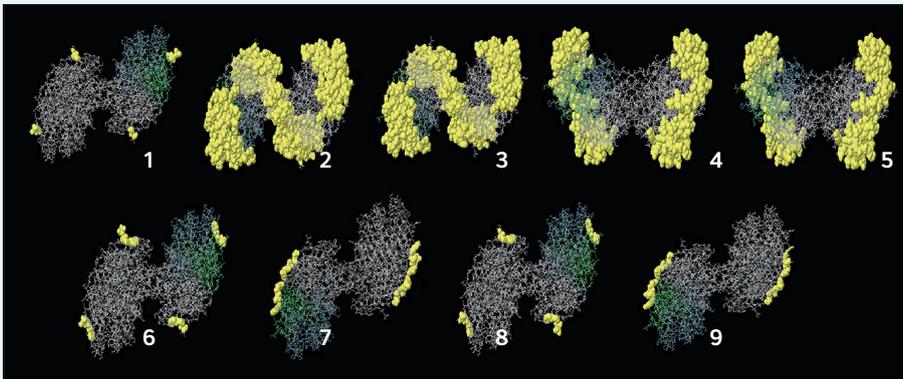
Henze G.
Professor, Berlin, Germany

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

Содержание

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 2020, 19 (1)

Оформление обложки:



3D Representation of the predicted discontinuous epitopes asparaginases protein of *Lupinus luteus*

Из статьи Milad Yazdi и соавт. (стр. 40)

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты терапии детей с острым миелоидным лейкозом и инициальным гиперлейкоцитозом по протоколу ОМЛ–ММ–2006 9

И.И. Калинина, Н.В. Захаров, Д.А. Венёв, Т.Ю. Салимова, У.Н. Петрова, О.В. Горонкова, Д.Д. Байдильдина, Е.В. Сунцова, М.Н. Садовская, Д.А. Евсеев, В.Е. Матвеев, К.С. Антонова, И.Г. Хамин, М.Э. Дубровина, Ю.В. Ольшанская, Е.А. Зеркаленкова, А.И. Манджиева, Д.Н. Балашов, Л.Н. Шелихова, М.А. Масчан, Г.А. Новичкова, А.А. Масчан

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Применение ромиплостима при впервые выявленной иммунной тромбоцитопении у детей 18

Е.В. Сунцова, И.И. Чиквина, М.Н. Садовская, Н.Н. Коцкая, Л.А. Хачатрян, Д.Д. Байдильдина, И.И. Калинина, У.Н. Петрова, А.В. Пшонкин, И.Я. Лутфуллин, Е.Н. Лемазина, И.В. Осипова, А.В. Галеева, О.С. Наумова, И.В. Фисюн, Г.В. Быкова, Г.Р. Казарян, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова

Наблюдение функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo* у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией 27

Д.С. Морозова, А.А. Мартьянов, М.А. Пантелеев, П.А. Жарков, Д.В. Федорова, А.Н. Свешникова

***In silico* assessment of plant L-asparaginase and estimating its allergenicity in comparison to bacteria asparaginase** 35

Milad Yazdi, Maryam Kolahi, Ali Mohamad Foroghmand, Mohammad Reza Tabandeh

Опыт применения препарата брентуксимаб ведотин в лечении детей и молодых взрослых с первично-рефрактерным течением и рецидивами лимфомы Ходжкина 47

М.Н. Корсантия, Ю.Е. Романкова, Н.В. Мякова, А.В. Пшонкин

Влияние режима приема дексаметазона на выявление нормальных В-клеточных предшественников в костном мозге у детей с острым лимфобластным лейкозом на момент окончания индукционной терапии 53

Е.В. Михайлова, Т.Ю. Вержбицкая, Ю.В. Румянцева, О.И. Илларионова, А.А. Семченкова, Л.Г. Фечина, А.И. Карачунский, А.М. Попов

- Иммунологические особенности В-линейных предшественников на 15-й день терапии острого лимфобластного лейкоза у детей. Сопоставление протоколов оценки минимальной остаточной болезни и собственные результаты** 58
О.А. Чернышева, И.Н. Серебрякова, Н.А. Купрышина, Е.Н. Шолохова, М.А. Шервашидзе, Б.В. Курдюков, А.В. Попа, Н.Н. Тупицын

- Неинвазивное определение неблагоприятного гистологического варианта у детей с нейрогенными опухолями по накоплению ¹²³I-МИБГ с использованием полуколичественной и количественной оценок** 68
Кайлаш, Е.Д. Киреева, И.С. Вдовина, М.Я. Ядгаров, Т.В. Шаманская, В.Ю. Роцин, Д.Ю. Качанов, Ю.Н. Ликарь

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

- Поражение кожи при лимфоме Беркитта: редкое клиническое наблюдение** 79
Т.Т. Валиев, Н.В. Матинян, Е.Г. Громова, М.А. Шервашидзе, Н.Н. Тупицын, Е.В. Захарова, Е.В. Михайлова, П.А. Керимов, К.И. Киргизов, С.Р. Варфоломеева
- Гемаза в терапии интравитреальных кровоизлияний и гемофтальма при тромбоцитопении вследствие острого миелоидного лейкоза у детей** 85
А.О. Копосова, А.Б. Петухова, И.И. Калинина, К.С. Антонова
- Сочетание гепатобластомы с опухолью желточного мешка в печени** 92
М.М. Морозова, А.В. Варламов, О.В. Должанский, А.В. Филин, Д.С. Бурмистров, О.В. Казакова, Е.С. Фоминых, Э.Ф. Ким

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича** 100
А.А. Мартыянов, Д.С. Морозова, А.Л. Хорева, М.А. Пантелеев, А.Ю. Щербина, А.Н. Свешникова

ШКОЛА ИММУНОЛОГА – МНЕНИЕ ЭКСПЕРТА

- Лимфаденопатия по типу болезни Розаи–Дорфмана у пациента с синдромом Вискотта–Олдрича: сложности диагностики** 108
О.А. Швец, Д.С. Абрамов, А.Л. Хорева, Д.Е. Першин, А.М. Киева, А.В. Пшонкин

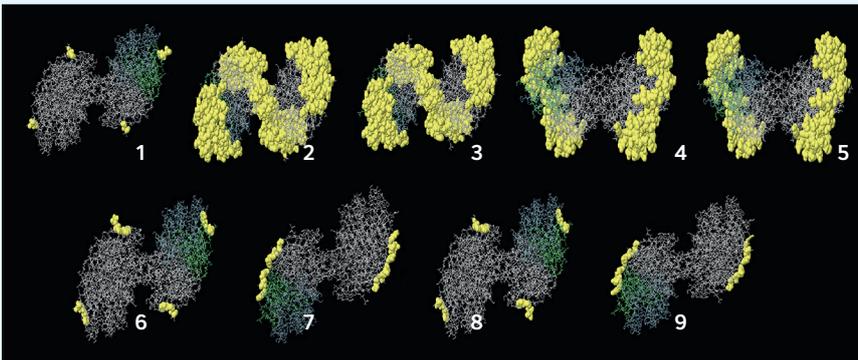
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- Гиперлейкоцитоз у детей с острым миелоидным лейкозом** 116
Н.В. Захаров, И.И. Калинина, Д.А. Венёв, Т.Ю. Салимова, Д.А. Евсеев, О.В. Горонкова, А.А. Масчан
- Дыхательная недостаточность у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями и методы ее коррекции** 122
А.Ю. Иванашкин, В.В. Лазарев
- Патологии системы комплемента** 131
А.А. Бутылин, А.Е. Филиппова, С.С. Шахиджанов, Ф.И. Атауллаханов
- Свертывание крови в XXI веке: новые знания, методы и перспективы для терапии** 139
Н.А. Подоплелова, В.Б. Сулимов, А.С. Тащилова, И.С. Ильин, М.А. Пантелеев, И.В. Леденева, Х.С. Шихалиев

РЕДАКЦИОННАЯ СТАТЬЯ

- Рекомендации 2020 года по диагностике и терапии инвазивного аспергиллеза у детей с онкогематологическими заболеваниями** 158
Г.Г. Солопова, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова

Cover design:



3D Representation of the predicted discontinuous epitopes asparaginases protein of *Lupinus luteus*

From the article
by Milad Yazdi, et al. (p. 40)

ADVANCED RESEARCH

The results of treatment in children with AML and initial hyperleucocytosis according to the AML-MM-2006 Protocol 9

I.I. Kalinina, N.V. Zacharov, D.A. Venev, T.Yu. Salimova, U.N. Petrova, O.V. Goronkova, D.D. Baydildina, E.V. Suntcova, M.N. Sadovskaya, D.A. Evseev, V.E. Matveev, K.S. Antonova, I.G. Khamin, Yu.V. Olshanskaya, E.A. Zerkalnikova, A.I. Mandgieva, D.N. Balashov, L.N. Shelikhova, M.A. Maschan, G.A. Novichkova, A.A. Maschan

ORIGINAL ARTICLE

Use of romiplostim for newly diagnosed immune thrombocytopenia in children 18

E.V. Suntsova, I.I. Chikvina, M.N. Sadovskaya, N.N. Kotskaya, L.A. Hachatryan, D.D. Baydildina, I.I. Kalinina, U.N. Petrova, A.V. Pshonkin, I.Ya. Lutfullin, E.N. Lemazina, I.V. Osipova, A.V. Galeeva, O.S. Naumova, I.V. Fisyn, G.V. Bikova, G.R. Kazaryan, A.A. Maschan, G.A. Novichkova

Observation of granulocyte function during *ex vivo* thrombus formation for patients with ANKRD26-associated thrombocytopenia 19

D.S. Morozova, A.A. Martyanov, M.A. Panteleev, P.A. Zharkov, D.V. Fedorova, A.N. Sveshnikova

***In silico* assessment of plant L-asparaginase and estimating its allergenicity in comparison to bacteria asparaginase** 35

Milad Yazdi, Maryam Kolahi, Ali Mohamad Foroghmand, Mohammad Reza Tabandeh

The experience of using the Brentuximab vedotin in the treatment of children and young adults with primary refractory course and relapses of Hodgkin's lymphoma 47

M.N. Korsantya, Y.E. Romankova, N.V. Myakova, A.V. Pshonkin

The influence of a dosage regimen of dexamethasone on detection of normal B-cell precursors in the bone marrow of children with BCP-ALL at the end of induction therapy 53

E.V. Mikhailova, T.Yu. Verzhbitskaya, J.V. Roumiantseva, O.I. Illarionova, A.A. Semchenkova, L.G. Fechina, A.I. Karachunskiy, A.M. Popov

Immunological features of B-linear progenitors on the 15th day of acute lymphoblastic leukemia therapy in children. Comparison of minimal residual disease assessment protocols and own results 58

O.A. Chernysheva, I.N. Serebryakova, N.A. Kupryshina, E.N. Sholokhova, M.A. Shervashidze, B.V. Kurdyukov, A.V. Popa, N.N. Tupitsin

Non-invasive prediction of an unfavorable histological variant in patients with neuroblastic tumors using the quantitative and semiquantitative assessment of ¹²³I-MIBG uptake 68

Kailash, E.D. Kireeva, I.S. Vdovina, M.Ya. Yadgarov, T.V. Shamanskaya, V.Yu. Roshin, D.Yu. Kachanov, Yu.N. Likar

CLINICAL OBSERVATION

- Skin involvement in Burkitt lymphoma: rare clinical case** 79
T.T. Valiev, N.V. Matinyan, E.G. Gromova, M.A. Shervashidze, N.N. Tupitsyn, E.V. Zakharova, E.V. Mikhailova,
P.A. Kerimov, K.I. Kirgizov, S.R. Varfolomeeva
- Gemase for treatment of intraretinal hemorrhages and hemophthalmia at thrombocytopenia due to acute myeloid leukemia in children** 85
A.O. Koposova, A.B. Petukhova, I.I. Kalinina, K.S. Antonova
- Combined hepatoblastoma and yolk sac tumor of the liver** 92
M.M. Morozova, A.V. Varlamov, O.V. Dolzhansky, A.V. Filin, D.S. Burmistrov, O.V. Kazakova, E.S. Fominikh, E.F. Kim

CLINICAL SIGNIFICANCE OF FUNDAMENTAL RESEARCH

- Specific features of intracellular calcium signalling, distinctive for Wiskott–Aldrich syndrome patients** 100
A.A. Martyanov, D.S. Morozova, A.L. Khoreva, M.A. Panteleev, A.Yu. Shcherbina, A.N. Sveshnikova

SCHOOL OF IMMUNOLOGY – EXPERT OPINION

- Rosay–Dorfman – like lymphadenopathy in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome: diagnostic difficulties** 108
O.A. Shvets, D.S. Abramov, A.L. Khoreva, D.E. Pershin, A.M. Kieva, A.V. Pshonkin

LITERATURE REVIEW

- Hyperleucocytosis in children with acute myeloid leukemia** 116
N.V. Zacharov, I.I. Kalinina, D.A. Venev, T.Y. Salimova, D.A. Evseev, O.V. Goronkova, A.A. Maschan
- Respiratory failure in children with oncohematological and immunological diseases: methods of treatment** 122
A.Y. Ivanashkin, V.V. Lazarev
- Pathologies of the complement system** 131
A.A. Butilin, A.E. Filippova, S.S. Shakhidzhanov, F.I. Ataulakhanov
- Blood coagulation in the 21st century: existing knowledge, current strategies for treatment and perspective** 139
N.A. Podoplelova, V.B. Sulimov, A.S. Tashilova, I.S. Ilin, M.A. Panteleev, I.V. Ledeneva, Kh.S. Shikhaliev

EDITORIAL

- Updated 2020 guidelines for diagnosis and treatment of invasive children with hematologic malignancy** 158
G.G. Solopova, A.A. Maschan, G.A. Novichkova

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-9-17

Результаты терапии детей с острым миелоидным лейкозом и инициальным гиперлейкоцитозом по протоколу ОМЛ–ММ–2006

И.И. Калинина¹, Н.В. Захаров², Д.А. Венёв¹, Т.Ю. Салимова¹, У.Н. Петрова¹, О.В. Горонкова¹, Д.Д. Байдильдина¹, Е.В. Сунцова¹, М.Н. Садовская¹, Д.А. Евсеев¹, В.Е. Матвеев¹, К.С. Антонова¹, И.Г. Хамин¹, М.Э. Дубровина¹, Ю.В. Ольшанская¹, Е.А. Зеркаленкова¹, А.И. Манджиева¹, Д.Н. Балашов¹, Л.Н. Шелихова¹, М.А. Масчан¹, Г.А. Новичкова¹, А.А. Масчан¹

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

² КГБУ «Красноярский краевой клинический центр охраны матери и детства» Минздрава России, Красноярск

Прогностическая роль гиперлейкоцитоза (ГЛ) при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) дискуссионна. В НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России 185 пациентов с ОМЛ получали терапию по протоколу ОМЛ–ММ–2006, в том числе 36 (19,5%) пациентов с ГЛ. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НИИЦ ДГОИ. Медиана уровня лейкоцитов составила $97 \pm 10^9/\text{л}$ ($50\text{--}428 \pm 10^9/\text{л}$). В группу высокого риска вошли 24 пациента, промежуточного риска – 8, стандартного – 4 пациента. Чаще встречался М5/М4 вариант ОМЛ по FAB-классификации – 30 пациентов. Самой частой генетической перестройкой была перестройка гена MLL – у 15 (42%) пациентов. Циторедукцию получили 35 пациентов, затем все получили блок ADE, а 21 пациент – вторую часть индукции, блок HAM. Ремиссии достигли 27 (77%) пациентов; ТГСК провели 23 пациентам; умерли 13 (36%) из 36; от лейкостаза – 4 (11%) человека. Для пациентов группы ГЛ общая выживаемость (OS) составила $0,56 \pm 0,09$; для группы без ГЛ – $0,75 \pm 0,04$ ($p = 0,005$); безрецидивная выживаемость (EFS) в группе ГЛ – $0,42 \pm 0,09$; EFS в группе без ГЛ – $0,49 \pm 0,04$ ($p = 0,026$). Статистически значимы были также достижение ремиссии, медиана продолжительности ремиссии, смерть до ремиссии ($p = 0,036$; $p = 0,028$; $p = 0,021$ соответственно). У пациентов с М4/М5, получающих циторедукцию при уровне лейкоцитов более $50 \pm 10^9/\text{л}$, показатели OS и EFS были лучше, чем у пациентов с лейкоцитами более $100 \pm 10^9/\text{л}$ во всей группе: OS – $0,71 \pm 0,1$ и $0,43 \pm 0,1$ ($p = 0,012$); EFS – $0,54 \pm 0,1$ и $0,29 \pm 0,1$ ($p = 0,038$) соответственно. Гиперлейкоцитоз ухудшает OS и EFS у детей с ОМЛ.

Ключевые слова: дети, острый миелоидный лейкоз, гиперлейкоцитоз, лейкостаз

Калинина И.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 9–17.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-9-17

The results of treatment in children with AML and initial hyperleucocytosis according to the AML-MM-2006 Protocol

I.I. Kalinina¹, N.V. Zacharov², D.A. Venev¹, T.Yu. Salimova¹, U.N. Petrova¹, O.V. Goronkova¹, D.D. Baydildina¹, E.V. Suntcova¹, M.N. Sadovskaya¹, D.A. Evseev¹, V.E. Matveev¹, K.S. Antonova¹, I.G. Khamin¹, Yu.V. Olshanskaya¹, E.A. Zerkalenkova¹, A.I. Mandgieva¹, D.N. Balashov¹, L.N. Shelikhova¹, M.A. Maschan¹, G.A. Novichkova¹, A.A. Maschan¹

¹ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow
² Krasnoyarsk Clinical Center of maternity and childhood, Krasnoyarsk

The prognostic role of HL in AML in children is a matter of a discussion. 185 patients were treated for AML in our center, 36 of 185 had HL (19.5%). The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. Median Le was $97 \times 10^9/\text{l}$ ($50\text{--}428 \pm 10^9/\text{l}$). Standard risk group were 4 pts, intermediate – 8, high – 24. The most common variants were M4/M5 in FAB classification – 30 pts and genetic rearrangement – MLL in 15 of 36 pts. Thirty-five patients with HL received cytoreduction course and ADE. After that, all patients received ADE and 21 pts second part of induction – course HAM. Remission was achieved in 27 (75%) out of 36 pts. HSCT was performed in 23 pts. Thirteen out of 36 patients with HL died: 4 (30%) – due to leukostasis complications. OS for HL group was 0.56 ± 0.09 , for non-HL group was 0.75 ± 0.04 , $p = 0.005$; EFS (HL) 0.42 ± 0.09 , EFS (non-HL) 0.49 ± 0.04 , $p = 0.026$. Also, differences in I CR achievement, median of remission length and death before remission between two groups were statistically significant ($p = 0.036$; $p = 0.028$; $p = 0.021$ respectively). OS and EFS in patients with M4/M5 with HL $> 50 \pm 10^9/\text{l}$ were better than in patients all FAB with HL $> 100 \pm 10^9/\text{l}$, OS 0.71 ± 0.1 vs OS 0.43 ± 0.1 ($p = 0.012$); EFS 0.54 ± 0.1 vs EFS 0.29 ± 0.1 ($p = 0.038$) respectively. HL significantly worsens OS and EFS in children with AML.

Key words: children, acute myeloid leukemia, hyperleukocytosis, leukostasis

Kalinina I.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 9–17.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-9-17

© 2020 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 19.09.2019

Принята к печати 28.10.2019

Контактная информация:

Калинина Ирина Игоревна, врач-гематолог отделения детской гематологии/онкологии НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1

E-mail: irina.kalinina@fccho-moscow.ru

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 19.09.2019

Accepted 28.10.2019

Correspondence:

Irina I. Kalinina, MD, Pediatrician Hematologist, Department of Pediatric Hematology/Oncology 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: irina.kalinina@fccho-moscow.ru

В структуре онкологических заболеваний детского возраста наибольшая доля принадлежит острым лейкозам, из них на долю острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) приходится 14–19% [1]. Благодаря внедрению современных протоколов интенсивной химиотерапии, аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток (ТГСК) и усовершенствованию технологии сопроводительной терапии показатели общей долгосрочной выживаемости при ОМЛ в развитых странах приближаются к 65–70%. На каждом из этапов лечения ОМЛ приходится сталкиваться с осложнениями либо самого заболевания, либо его терапии, которые являются потенциально жизнеугрожающими. На начальном этапе терапии самый грозный фактор риска ранней летальности – гиперлейкоцитоз (ГЛ), который встречается у 5–20% пациентов с первично диагностированным ОМЛ. В большинстве протоколов ГЛ при ОМЛ – это повышение количества лейкоцитов (WBC) более $100 \times 10^9/\text{л}$ [1, 2], однако эта цифра условная, самое опасное осложнение ГЛ – лейкостаз – может развиваться при существенно более низком числе лейкоцитов.

Гиперлейкоцитоз – жизнеугрожающее клиническое проявление ОМЛ с высоким риском фатального повреждения легких и головного мозга – требует незамедлительного начала циторедуктивной терапии и мультидисциплинарного ведения с активным участием детских реаниматологов [3]. По данным литературы, риск ранней смерти максимален у пациентов с числом WBC $> 200 \times 10^9/\text{л}$ [4].

Ассоциация ГЛ с повышенным риском ранней летальности неоспорима, но его независимое от других факторов прогноза (цитогенетических характеристик, молекулярно-генетических аномалий) влияние на эффективность стандартной химиотерапии и показатели безрецидивной выживаемости дискуссионны. В данной статье мы анализируем исходы терапии пациентов с впервые диагностированным ОМЛ и инициальным ГЛ, получавших лечение согласно единому протоколу в крупном специализированном центре детской гематологии/онкологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. С февраля 2012 по декабрь 2017 года 185 пациентов (105 мальчиков и 80 девочек) в возрасте от 7 дней до 18 лет (медиана – 7 лет) с впервые диагностированным ОМЛ получили терапию по протоколу ОМЛ–ММ–2006. Пациентов с промиелоцитарным лейкозом, вторичным ОМЛ, миелосаркомой без поражения костного мозга в данное исследование не включали.

Согласно протоколу ГЛ определяли как уровень WBC $> 50 \times 10^9/\text{л}$ для пациентов с М4–М5 FAB-субвариантами ОМЛ и WBC $> 100 \times 10^9/\text{л}$ – для всех других субвариантов.

Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения XLSTAT и электронной таблицы Excel. Вероятность общей и бессобытийной выживаемости рассчитана по методу Каплана–Майера; кумулятивная вероятность – по методу конкурирующих рисков. Для непараметрических количественных данных определяли медиану, максимум и минимум вариационного ряда. Живые пациенты цензурировались на момент статистической обработки данных (декабрь 2017 года). Достоверность различий между исследуемыми группами вычисляли по методу Манна–Уитни с помощью критерия χ^2 , точного теста Фишера. Оценивали доверительную вероятность p : различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. За событие принимали: смерть от любых причин, рецидив, рефрактерность после курса индукции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для всей группы пациентов медиана WBC составила $13,6 \times 10^9/\text{л}$ ($0,3 \times 10^9/\text{л}$ – $428 \times 10^9/\text{л}$). Инициальный ГЛ зафиксирован у 36 (19,5%) пациентов (17 девочек и 19 мальчиков). Медиана возраста пациентов с ГЛ – 7 лет 8 мес. (от 7 дней до 18 лет); возраст 4 пациентов был менее 1 года. Медиана WBC для группы с ГЛ – $97 \times 10^9/\text{л}$ (50 – $428 \times 10^9/\text{л}$).

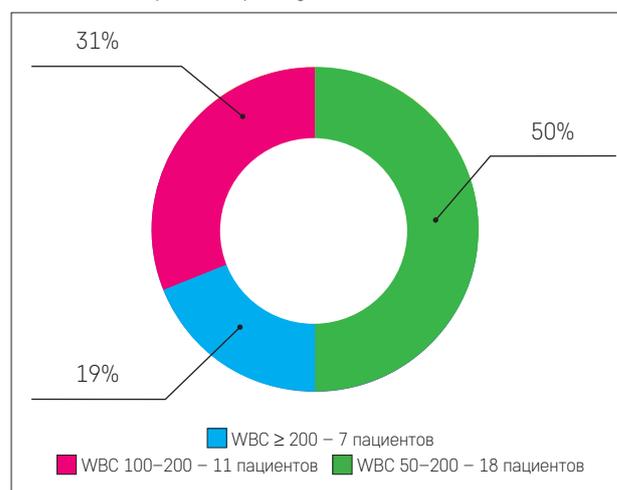
Пациентов разделили на три группы: 1-я группа – 7 человек с WBC $> 200 \times 10^9/\text{л}$; 2-я группа – 11 человек с WBC от 100 до $200 \times 10^9/\text{л}$; 3-я группа – 18 человек с WBC от 50 до $100 \times 10^9/\text{л}$ (рисунок 1). Чаще встречался М5 вариант ОМЛ согласно

Рисунок 1

Распределение пациентов в зависимости от количества лейкоцитов

Figure 1

Distribution of the patients depending on the number of white blood cells count



FAV-классификации – у 18 (50%) пациентов; M4 – у 14 (39%); M1 – у 3 (8%) и M2 – у 1 (3%) пациента.

Клинические особенности в данной группе: у 31 пациента отмечено наличие гепатомегалии; медиана – 2 см (от 0 до 8 см из-под края реберной дуги); у 24 пациентов – спленомегалия; медиана – 1,5 см (от 0 до 12 см из-под края реберной дуги). Экстрамедулярное/экстрагемопоэтическое поражение наблюдалось у 9 пациентов; чаще – поражение кожи и подкожно-жировой клетчатки – у 4 пациентов; по одному случаю – плеврит, поражения яичек, орбиты, мягких тканей бедра, лимфатических узлов вместе со слюнной железой и окружающими мягкими тканями.

Достоверно оценить наличие инициального поражения центральной нервной системы (ЦНС) было сложно в связи с тем, что 22 (61%) пациентам из 36 первичную люмбальную пункцию проводили только по окончании курса индукционной химиотерапии; 3 пациентам ее не проводили из-за смерти (2 пациента) или тяжести состояния (1 пациент). У 8 пациентов выявлен ЦНС, статус II (наличие бластов при цитозе ликвора < 5 мононуклеаров в 1 мкл); статус III (наличие бластов, цитоз ликвора 5–10 мононуклеаров в 1 мкл) – у одного; статус IV (наличие бластов, цитоз ликвора > 10 мононуклеаров в 1 мкл) – у 2 пациентов.

Цитогенетические характеристики лейкозных клеток пациентов с ГЛ представлены в *таблице 1*. Наиболее частой цитогенетической аномалией была перестройка гена *MLL* – у 15 (41,6%) из 36 пациентов, при этом в группе пациентов с реаранжировкой гена *MLL* более половины составляли пациенты с *t(10;11)* и *t(9;11)* (*рисунок 2*).

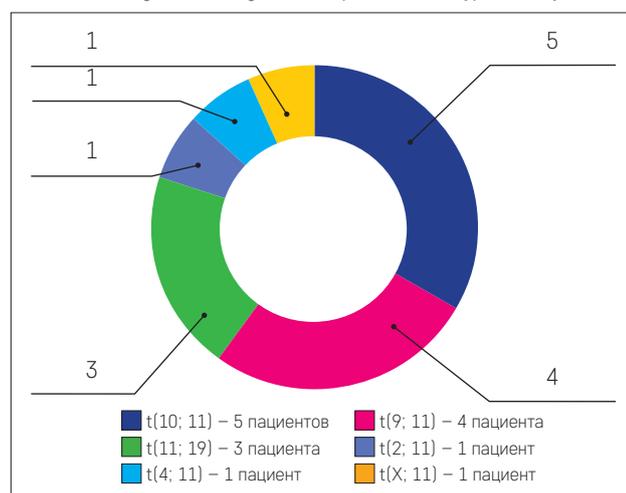
Терапия. Всем 36 пациентам, кроме одного, провели специфическую полихимиотерапию (ПХТ);

Рисунок 2

Варианты перестроек гена *MLL* у пациентов с гиперлейкоцитозом

Figure 2

Variants of *MLL* gene rearrangements in patients with hyperleukocytosis



у одного пациента констатировали спонтанную клинко-гематологическую ремиссию через 17 дней после установления диагноза ОМЛ. Все пациенты с ГЛ перед началом основной индукционной ПХТ получали циторедуктивную терапию: даунорубин – 22,5 мг/м²/сут и этопозид – 50 мг/м²/сут, постоянной инфузией, до тех пор, пока уровень лейкоцитов не составит 50 × 10⁹/л; далее – курс цитарабина, даунорубина и этопозида (ADE) с пропорционально редуцированными дозами даунорубина и ADE. Медиана длительности циторедуктивной фазы – 3 дня (от 2 до 6 дней).

Одновременно с циторедуктивной терапией пациенты получали профилактику синдрома опухолевого лизиса (СОЛ): гиперинфузию; аллопуринол или разбуриказу; дексаметазон – 0,6–0,8 мг/кг/сут; пентоксифиллин – 20 мг/кг/сут, постоянной инфузией. До снижения лейкоцитоза менее 50 × 10⁹/л содержание гемоглобина в крови поддерживали на уровне не более 70 г/л; концентрат тромбоцитов переливали для поддержания их уровня более 50 × 10⁹/л.

Только двум пациентам выполнили однократные процедуры физического удаления лейкоцитов – лейкоцитозферез или заменное переливание крови. Курс ADE получили все 35 пациентов; блок НАМ (15-й и 16-й дни) – лишь 20 (62,5%) пациентов из 32, которым он был предписан протоколом. Полная клинко-гематологическая ремиссия (ПР) ОМЛ после курса индукции достигнута у 27 (75%) пациентов. В дальнейшем 4 из 6 пациентов, пережившие курс индукции, но не достигшие ремиссии, достигли ПР после следующих блоков ПХТ и/или ТГСК – всего частота достижения ремиссии составила 86% (31 из 36 пациентов).

От осложнений лейкостаза умерли 4 пациента: трое – до 14-го дня от начала химиотерапии; один (с массивным внутримозговым кровоизлиянием на ранних сроках терапии) был признан incurable, не получал дальнейшей химиотерапии и умер в поздние сроки от полиорганной недостаточности.

Постиндукционная терапия. Согласно протоколу инициальные показания к проведению ТГСК имели 24 (67%) из 36 пациентов группы ГЛ. Еще у 4 пациентов показания к проведению ТГСК возникли после рецидива ОМЛ (один пациент – из группы стандартного риска; трое – из группы промежуточного риска). Запланированную ТГСК провели 23 пациентам; 5 пациентов не получили ТГСК (трое – в связи со смертью в индукции; двое – из-за прогрессии ОМЛ). ТГСК от HLA-идентичного родственного донора проведена трем пациентам в ПР I (все они живы). ТГСК от гаплоидентичного семейного донора выполнена 11 пациентам, в том числе 8 – в ПР I (7 – живы; один умер

Таблица 1

Цитогенетические характеристики лейкозных клеток пациентов с гиперлейкоцитозом

Table 1

Cytogenetic characteristics of leukemia cells in patients with hyperleukocytosis

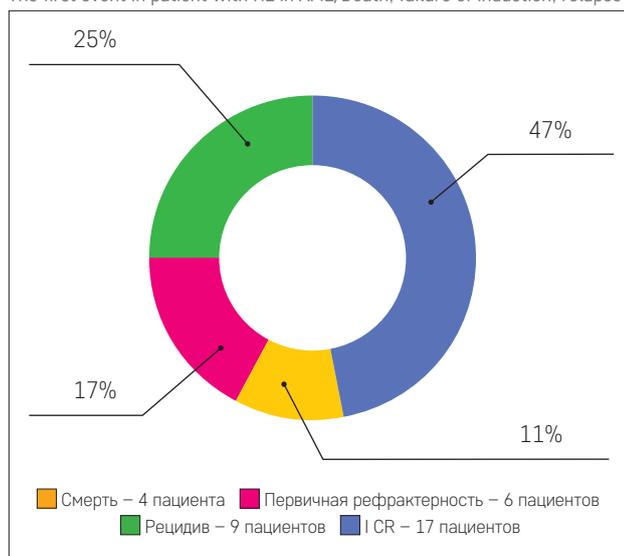
№	Стандартная цитогенетика Standard cytogenetics	Молекулярная биология Molecular biology
1	46XY	t(11;19) ELL MLL/ELL
2	46XY	Не обнаружены / Not detected
3	46XY, del(13)(q12;p14)(1)/46XY(19)	Не обнаружены / Not detected
4	46XX,der(8?)add(q24), +der(12?)add(q24), +mar(cp3)/46,XX(17)	FLT3
5	Трисомия 13 хромосомы / Trisomy 13	t(2;11)
6	46XX	Не обнаружены / Not detected
7	Сложная форма t(10;11) с перестройкой гена <i>MLL</i> A complex form of t(10; 11) with <i>MLL</i> gene rearrangement	t(10;11) MLL/AF10
8	46-53, XX, +1, +4, +6, +7, +8,del(11q23), +16,der(19) t(11;19)(q23;p13?), +mar(10)	t(11;19)ENL MLL/ENL
9	Нет митозов / No mitosis	Не обнаружены / Not detected
10	49XX, +X, +6, +8, t(10;11)(p13;q23), del(12p)(10)	t(10;11) MLL/AF10
11	Методом FISH обнаружена нетипичная перестройка гена <i>MLL</i> The atypical <i>MLL</i> gene rearrangement was detected by FISH	t(10;11) MLL/AF10
12	Обнаружено 2 клона при стандартном кариотипировании: 1-й - с трисомией 8; 2-й - с дериватом 19 хромосомы 2 clones were found: the 1 st - with trisomy 8, the 2 nd - with the derivative chromosome 19	FLT3
13	45X,-Y,t(8;21)(15)/46XY	t(8;21) AML/ETO
14	+8, t(11;14)(p13;q11)del(12). Методом FISH обнаружена перестройка TCR alpha/delta The TCR alpha/delta rearrangement was detected by the FISH	Нет данных / Not data
15	46-47XY, -8, del(9)(q22,add11(q23)+12, +12, -22. Методом FISH обнаружена aberrантная форма t(9;11). <i>MLL</i> в отпечатке лимфоузла The aberrant form of t(9;11) was found by FISH. <i>MLL</i> in the lymph node imprint	t(9;11) MLL/AF9
16	46XX,der(1)inv?(1)(p12p36),der(9)del(p13),der(11)del(p14)add(q23),der(20?)add(p13) (4)/46XX,der(1)inv?(1)(p12p36),der(9)del(p13),der(11)del(p14)add(q23),der(12) add(p11),der(20?)add(p13)(16)	t(9;11) MLL/AF9
17	48XX,t(4;11)(q21;q23);+der(4)t(4;11),+8(16)/51,XX,t(4;11),+der(4)t(4;11)*2, +8,+8,+19(2)/47, XX,+der(1)del(1)(p13),t(4;11)(q21;q23)/46,XX(1) MLL/AFF1 t(4;11)	t(4;11) MLL/ AF6
18	46XY	c-kit
19	47XX,del(1)(p35),+8,t(11;19)(q23;p13.3)(20)	t(11;19)ENL MLL/ENL
20	46XY	Не обнаружены / Not detected
21	t(9;11)(p21;q23)	t(9;11) MLL/AF9
22	47XY,+8,t(9;11)(p12;q23)(10)	t(9;11) MLL/AF9
23	46XY	FLT3
24	t(10;11)(p11;q23); методом FISH обнаружена перестройка гена <i>MLL</i> <i>MLL</i> gene rearrangement was detected by FISH	t(10;11) MLL/AF10
25	Нет митозов. Методом FISH обнаружена перестройка гена <i>ETV6</i> с делецией 3-конца <i>ETV6</i> gene rearrangement with 3-end deletion was detected by FISH method	ETV6
26	46XX	Не обнаружены Not detected
27	46XY	Не обнаружены / Not detected
28	47XY,+8,der(11)add(q23)(7), перестройка гена <i>MLL</i> <i>MLL</i> gene rearrangement was detected	Не обнаружены / Not detected
29	45XX,-9,der(10)add(p12),del(10)(p11),der(19) / t(9;19)(p13;q13)(7). t(10;11) MLL/AF10	t(10;11) MLL/AF10 FLT3
30	Нет данных / Not data	Нет данных / Not data
31	Нет митозов / No mitosis Методом FISH обнаружена перестройка гена <i>CBFB</i> (inv16) <i>CBFB</i> (inv16) gene rearrangement was detected by FISH	inv(16) CBFB/MYH11
32	inv(16)	inv(16) CBFB/MYH11
33	Нет митозов / No mitosis Методом FISH перестроек не обнаружено / Rearrangements were not detected by FISH	FLT3 + NPM1
34	inv(16)	inv(16) CBFB/MYH11
35	Моносомия 7 в 98% ядер / Monosomy 7 in 98% of nuclei	Не обнаружены / Not detected
36	inv(16)	inv(16) CBFB/MYH11

Рисунок 3

Первое событие у пациентов с гиперлейкоцитозом при ОМЛ

Figure 3

The first event in patient with HL in AML/Death, failure of induction, relapse



от рецидива); 3 – в статусе активного заболевания (все умерли). ТГСК от неродственного донора провели 11 пациентам: 7 – в ПР I (4 – живы; 3 – умерли); одному – в активной фазе заболевания (умер от рецидива после ТГСК); одному – в ПР II (пациент жив).

Таким образом, в первой или второй ПР живы 15 (62,5%) из 24 реципиентов ТГСК. Инициально ТГСК не планировали 12 пациентам из группы стандартного и промежуточного цитогенетического риска: 10 (83%) из них достигли ПР1; полностью завершили протокол только 6 (50%) пациентов – они остаются в ПР1; никто из пациентов не умер от осложнений дальнейшей ПХТ. У 3 (25%) пациентов развился рецидив ОМЛ; двое были рефрактерны к первой линии терапии; один пациент умер в ПР от полиорганной недостаточности.

Медиана продолжительности ремиссии во всей группе больных с ГЛ составила 12 мес. (от 1,6 до 63 мес.). Первое событие представлено на рисунке 3.

Таблица 2

Характеристика пациентов с рецидивом ОМЛ в группе пациентов с гиперлейкоцитозом

Table 2

Characteristics of patients with recurrent AML in HL group

Пациент Pts	Возраст Age	Группа риска Risk group	WBC × 10 ⁹ /л	Титульная транслокация Main translocation	Продолжительность ПР1, мес Duration CR 1, months	Терапия рецидива Relapse therapy	ПР2 CR2	ТГСК BMT	Исход Outcome
1	17 лет 17 years	Выс. HR	246	t(11;19)	9,5 мес. 9,5 months	Вайдаза + велкейд + вальпроевая кислота + DLI + ТГСК 2 (гапло) Vidaza + VelcVidaza + Velcade + Valproic acid + DLI + HSCT 2 (haplo)	Нет No	1-я - в ПР1 in CR1 2-я - в AD in AD	Смерть после второй ТГСК (сепсис) Death after the second HSCT (sepsis)
2	14 дней 14 years	Выс. HR	100	t(2;11)	2,8 мес. 2,8 months	FLAM	Да Yes	В ПР2 CR2 MUD	Жив в ПР2 Alive in CR2
3	1,5 года years	Выс. HR	79	t(10;11)	8,2 мес. 8,2 months	CLAM + ТГСК2 (гапло / haplo)	Да Yes	1-я - в ПР 1-я - in CR1 2-я - в AD 2-я - in AD	Жив в ПР2 Alive in CR2
4	3 года 3 years	Выс. HR	89	t(11;19)	1,7 мес. 1,7 months	CLAM	Да Yes	Гапло в AD Haplo in AD	Смерть от прогрессии (2-й рецидив после гапло) Death from progression (2nd relapse after haplo)
5	3 года 3 years	Пром. IR	195	Нет No	5,5 мес. 5,5 months	Неларабин (рецидив Т-ОЛЛ) Nelarabin (T-ALL relapse)	Нет No	Гапло в AD Haplo in AD	Смерть от прогрессии Death from progression
6	3 года 3 years	Выс. HR	100	Complex	14,7 мес. 14,7 months	Терапия ОЛЛ, высокий риск + блинатумумаб (в рецидиве ОБЛ) Therapy ALL, HR + blinatumomab (relapse ABL)	Да Yes	1-я (алло неродственная) в ПР1 MUD, 1 st PR	Смерть в день 0 (сепсис) после кондиционирования перед второй ТГСК Death on day 0 (sepsis) after conditioning before the second HSCT
7	18 лет 18 years	Пром. IR	60	Нет No	2 мес. 2 months	Терапия по протоколу ОЛЛ МБ-2015 (в рецидиве ОЛЛ) Protocol ALL-MB-2015 therapy (relapse ALL)	Да Yes	Нет No	Жив в ПР1 Alive in CR1
8	9 лет 8 мес. 9 years 8 moth	Выс. HR	165	t(11;19)	4 мес. 4 months	FLAM	Да Yes	Гапло в ПР1 Haplo in CR1	Смерть от прогрессии (комбинированный рецидив после гапло-ТГСК) Death from progression (combined relapse after haplo HSCT)
9	2,5 года 2,5 years	Ст. StR	160	inv(16)	4,4 мес. 4,4 months	Дакоген (рецидив молекулярный) Dacogen (molecular relapse)	Да Yes	Гапло в ПР1 (сохранение транскрипта) Haplo in AD	Жив в ПР1 Alive in CR1

Примечание / Notes: Ст. – стандартная / standard; Пром. – промежуточная / intermediate; Выс. – высокая / high; DLI – инфузия донорских лимфоцитов / donor lymphocytes infusion; ПР – полная ремиссия / CR – complete remission; АД – активное заболевание / active disease; ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток / HSCT – hematopoietic stem cell transplantation; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз / acute lymphoblastic leukemia; ОБЛ – острый бифенотипический лейкоз / acute biphenotypic leukemia; FLAM – флюдарабин, цитозар, митоксантрон / fludarabine, cytarabine, mitoxantrone; CLAM – кладрибин, цитозар, митоксантрон / cladribine, cytarabine, mitoxantrone.

Рецидивы. У 9 (33%) из 27 пациентов, достигших ПР1 после индукционной ПХТ, констатирован рецидив основного заболевания; только у одного из них рецидив был поздним (через 1 год и 4 мес.); у 8 пациентов отмечен ранний рецидив. Медиана развития рецидива – через 4 мес. от констатации ПР1 (от 1,7 до 10 мес.). Характеристика пациентов с рецидивом ОМЛ в группе пациентов с ГЛ представлена в таблице 2.

Всего из 31 пациента, у которых на каком-либо этапе терапии была достигнута ПР1, рецидив зарегистрирован у 10 (32%), причем у 2 пациентов лейкоэмические клетки в рецидиве имели смешанный (миело + лимфо), а у одного пациента со сверхранным рецидивом (через 2 мес. от достижения ПР1) – лимфоидный фенотип. Медиана безрецидивного интервала составила 8,8 мес. (от 1,7 до 16 мес). Всем рецидивировавшим пациентам сделана попытка куративной терапии; 4 из них живы: трое – после ТГСК; один – без трансплантации после химиотерапии согласно протоколу ОЛЛ. Медиана длительность текущей ремиссии у 4 выживших пациентов составила 8,8 мес. (от 2,8 до 16 мес.).

Из четырех пациентов, рефрактерных к индукционной терапии и в дальнейшем достигших ПР1, которым провели ТГСК, живы двое; один умер от рецидива после ТГСК, один – от вирусной инфекции после ТГСК в ПР1.

Структура летальных исходов. В группе пациентов с ГЛ умерли 13 (36%) из 36 человек, в том числе 4 (30%) – из-за осложнений, связанных с лейкостазом (трое – до ремиссии ОМЛ): непосредственными причинами их смерти стал лейкостаз с поражением легких и ЦНС, а также развитие ДВС-синдрома и СОЛ. У одной пациентки на фоне лейкостаза при содержании лейкоцитов $428 \times 10^9/\text{л}$ с поражением ЦНС развилось кровоизлияние в головной мозг, кома; после достижения ПР1 ребенок был признан некурабельным в связи с вегетативным статусом (смерть наступила от полиорганной недостаточности).

От прогрессии основного заболевания умерли 6 (46%) из 13 пациентов; четверо – после ТГСК. От осложнений, связанных с проведением ТГСК, умерли два пациента; одна из них – в день 0 после кондиционирования перед повторной ТГСК.

Таким образом, на сегодняшний день среди пациентов с инициальным ГЛ живы 23 (54%) из 36 пациентов: 19 – в ПР1 и 4 – в ПР2.

Сравнение инициальных характеристик и исходов терапии у пациентов с ГЛ и без ГЛ. Основным статистически значимым различием в проведенном исследовании стала вероятность «смерти в индукции» пациентов с ГЛ, что повлияло также на вероятность достижения ремиссии. Кроме того, у пациентов с ГЛ продолжительность ПР1 была

Таблица 3

Сравнительная таблица результатов терапии в группе пациентов с ОМЛ с ГЛ и без ГЛ

Table 3

Comparative table of treatment results in a group of patients with AML with and without HL

Показатель Indicator	Группа пациентов с ГЛ Group of patients with HL	Группа пациентов без ГЛ Group of patients without HL	p где применимо where applicable
Количество пациентов Number of patients	36	149	
Мальчики : Девочки boys : girls	19 : 17	86 : 63	0,6
Соотношение ratio	1,1 : 1	1,4 : 1	
Медиана возраста Median age	7 лет 8 мес. (7 дней–18 лет)	8 лет 7 мес. (5 мес.–18 лет)	0,78
Наиболее частый вариант по FAB-классификации The most frequent option by FAB classification median	M5	M5	
WBC (медиана / median)	$97 \times 10^9/\text{л}$ (50–428)	$9,2 \times 10^9/\text{л}$ (0,3–79)	0,0001
Гепатомегалия Hepatomegaly	31 пациент (86%)	100 пациентов (67%)	0,025
Спленомегалия Spleno megaly	24 пациента (67%)	61 пациент (41%)	0,006
Нейролейкоз Neuroleukemia	9 (25%)	40 (27%)	0,8
Экстремедуллярное поражение Extramedullary lesions	9 (25%)	24 (16%)	0,2
MLL : CBF : NK	15 : 6 : 8	18 : 33 : 24	0,017
Группа риска Risk group			
Стандартная Standard	4 (11%)	8 (22%)	0,011
Промежуточная Intermediate	8 (5,4%)	74 (49,6%)	
Высокая High	24 (67%)	67 (45%)	
ICR после индукции ICR after induction	27 (75%)	132 (88,6%)	0,036
Неудача индукции Failure of induction	6 (16%)	15 (10%)	0,26
Медиана продолжительности ремиссии, мес. Median duration of remission, month	12 (1,6–63)	22 (0,5–70)	0,028
Рецидив Relapse	9 (33%)	42 (30%)	0,7
Жив Alive	23 (64%)	119 (80%)	0,04
I CR	19 (53%)	100 (67%)	
II CR	4 (11%)	19 (13%)	
Смерть Death	13 (36%)	30 (20%)	0,04
прогрессия progression	6 (16%)	19 (12,6%)	
инфекция infection	4 (11%)	9 (6%)	0,021
до ремиссии before remission	3 (9%)	2 (1,4%)	

короче. В то же время статистический анализ инициальных характеристик и исходов терапии у пациентов с разными градациями ГЛ не обнаружил статистических различий между пациентами с ГЛ при $WBC 50-100 \times 10^9/л$; $100-200 \times 10^9/л$ и более $200 \times 10^9/л$ (таблица 3). Анализ групп пациентов, разделенных по инициальному количеству лейкоцитов, представленный в таблице 4, не показал статистически значимых результатов.

Таблица 4
Анализ групп пациентов по инициальному уровню лейкоцитов

Table 4
The analysis of the patients' groups according to the initial level of leukocytes

Анализируемая характеристика The analyzed characteristics	WBC 50–100 × 10 ⁹ /л	WBC 100–200 × 10 ⁹ /л	WBC > 200 × 10 ⁹ /л	p
Кол-во пациентов Number of patients	18	11	7	
M4-M5 (FAB)	18	8	6	0,58
Группа риска Risk group				0,53
стандартная Standard	2	2	0	
промежуточная Intermediate	3	2	3	
высокая High	13	7	4	
Экстремедуллярное поражение Extramedullary lesions	5	1	3	0,3
Цитогенетика Cytogenetics				
MLL	10	3	2	0,5
CBF	3	2	0	
ICR после индукции ICR after induction	13	10	4	0,28
Рецидив Relapse	3	5	1	0,1
Смерть до ремиссии Death before remission	2	1	0	0,6
Смерть Death	5	4	4	0,1

Анализ выживаемости в исследуемой группе представлен на рисунках 4–6. Различия в группах пациентов с ГЛ и без ГЛ статистически достоверны. Таким образом, инициальное наличие ГЛ ухудшает прогноз пациентов с ОМЛ.

В нашем исследовании не получено различий в выживаемости в зависимости от инициального количества WBC – возможно, это связано с малочисленностью группы больных с ГЛ. Показано также, что в группе пациентов с M4/M5 и $WBC > 50 \times 10^9/л$ общая выживаемость выше, чем у пациентов с $WBC > 100 \times 10^9/л$, при всех вариантах ОМЛ по FAB-классификации. Такие же данные получены при анализе бессобытийной выживаемости. Возможно, это

Рисунок 4

Общая выживаемость в исследуемых группах (с ГЛ и без ГЛ)

Figure 4

OS in study groups (with and without hyperleukocytosis)

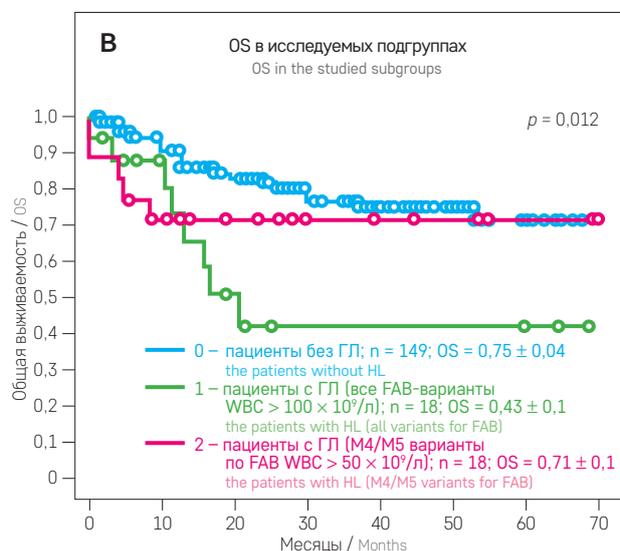
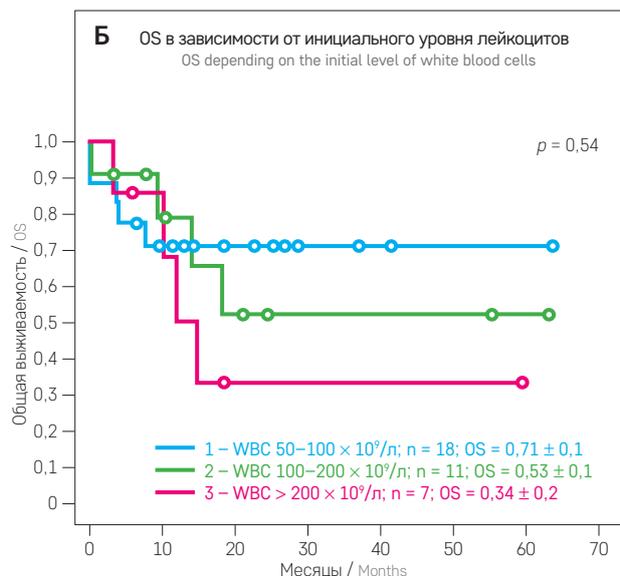
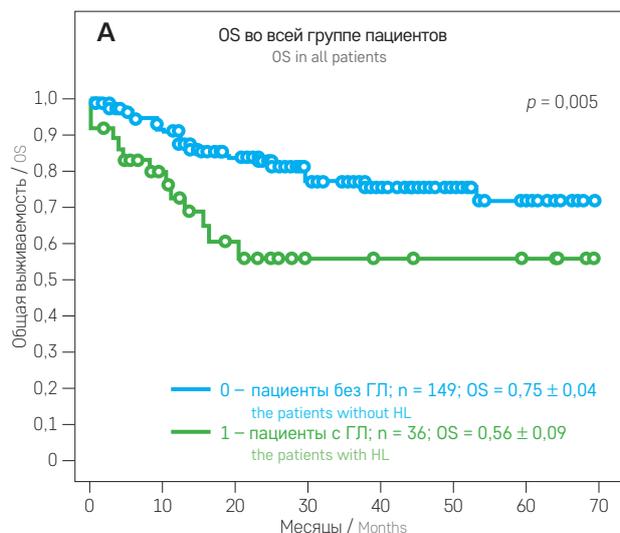
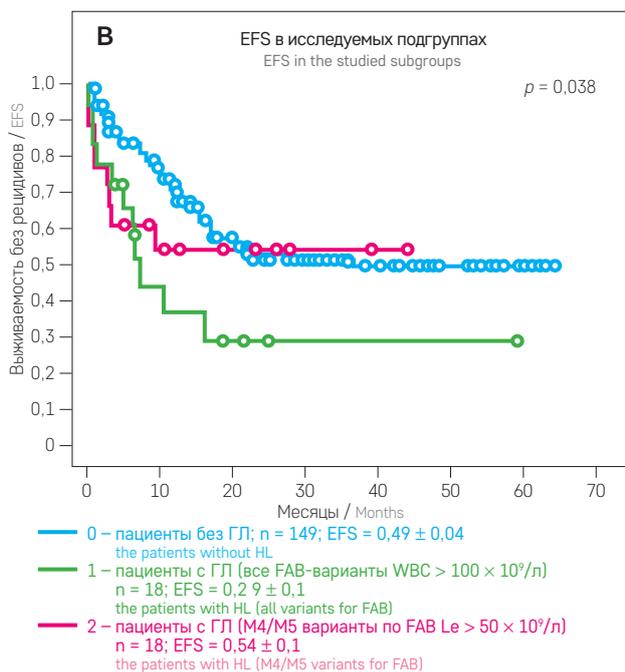
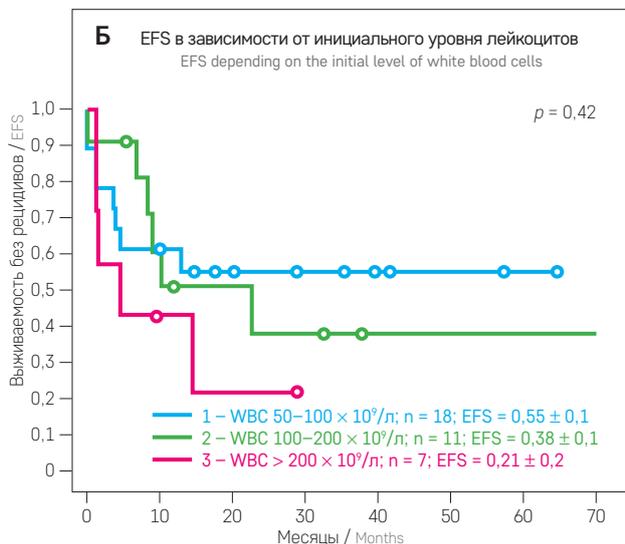
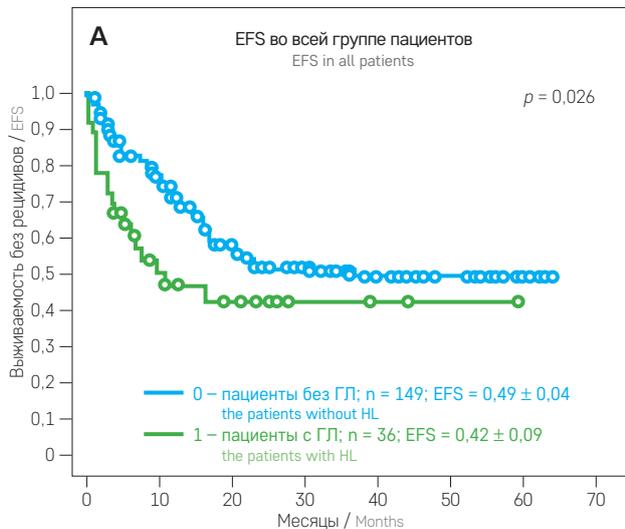


Рисунок 5

Выживаемость без рецидивов в исследуемых группах (с ГЛ и без ГЛ)

Figure 5

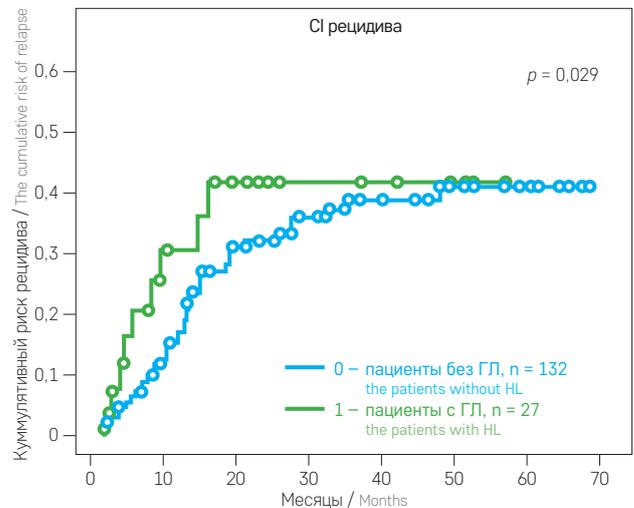
EFS in study groups (with and without hyperleukocytosis)

**Рисунок 6**

Куммулятивный риск рецидива в исследуемых группах (с ГЛ и без ГЛ)

Figure 6

The cumulative risk of relapse in study groups (with and without hyperleukocytosis)



связано с тем, что циторедукция для пациентов M4/M5 начинается раньше, а именно, при достижении числа WBC $50 \times 10^9/l$. При анализе куммулятивного риска рецидива достоверных значений не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гиперлейкоцитоз у пациентов с ОМЛ – неотложное состояние, чреватое тяжелейшими осложнениями в виде церебрального и легочного лейкостаза, требующее слаженной работы высококлассной мультидисциплинарной команды в составе гематологов/онкологов, реаниматологов, владеющих афферентными технологиями, трансфузиологов, специалистов по визуализации, неврологов и офтальмологов. Чаще всего пациенты с ГЛ – это дети первых трех лет жизни с ОМЛ, характеризующимся реаранжировками гена *MLL*, хотя и цитогенетически благоприятные субварианты, в частности *inv16*, не редкость в данной группе. У детей с ОМЛ и ГЛ тяжесть состояния чаще всего обусловлена лейкостазом, а не синдромом лизиса опухоли, как у пациентов с ОЛЛ.

Зачастую поражения легких, головного мозга и органов брюшной полости имеют субклинический характер и становятся очевидны только после начала ПХТ. В связи с этим до начала циторедуктивной терапии необходимо выполнять МРТ головного мозга, КТ легких, брюшной полости, требуется также осмотр офтальмолога.

Мы настоятельно рекомендуем упреждающий перевод пациентов с ОМЛ и ГЛ, особенно раннего возраста, в отделение ОРИТ, где следует начинать специфическую химиотерапию, учитывая частую необходимость проведения искусственной вентиляции легких из-за лейкомического повреждения легких и

высокого риска развития неврологических осложнений на фоне лейкостаза в сосудах головного мозга.

Оптимальный метод циторедукции при ГЛ не выработан; лейкаферез и заменные переливания крови быстро снижают количество циркулирующих бластных клеток, однако, по всей вероятности, не влияют на вероятность развития лейкостаза, поскольку его вызывают лейкемические клетки, адгезирующие к стенке микрососудов и проникающие в интерстиций легких и головного мозга. Нет объективных данных и в пользу какого-либо химиотерапевтического вмешательства (малые дозы цитарабина, гидроксимочевина, 6-меркаптопурин), анализ данных литературы не позволяет предпочесть тот или иной подход. Роль таких препаратов, как глюкокортикоиды в высоких дозах, еще менее изучена.

В течение 20 лет наша группа использует для циторедукции и профилактики синдрома лейкостаза круглосуточные инфузии низких доз даунорубицина и этопозиды в сочетании с высокими дозами дексаметазона, результаты такого подхода не уступают данным, опубликованным в литературе [5–9]. В нашем исследовании развитие смертельного синдрома лейкостаза зарегистрировано у 4 (11%) из 36 пациентов.

Влияние инициального гиперлейкоцитоза на вероятность достижения ремиссии и конечные результаты лечения (вероятность рецидива, длительность ремиссии) также окончательно не определено. В нашем исследовании пациенты с М4- и М5-вариантами и ГЛ при $WBC\ 50\text{--}100 \times 10^9/\text{л}$ имели общую и бессобытийную выживаемость, сопоставимую с группой с лейкоцитозом при $WBC < 50 \times 10^9/\text{л}$, а пациенты с лейкоцитозом при $WBC > 100 \times 10^9/\text{л}$ – достоверно худшие показатели. В то же время малое число наблюдений и преобладание в данной группе пациентов с ОМЛ высокой цитогенетической группы

риска заставляет интерпретировать наши данные с осторожностью. Таким образом, инициальный ГЛ зарегистрирован у 19,5% неселектированных пациентов, последовательно включенных в протокол ОМЛ–ММ–2006 за 5-летний период. Смертность от осложнений ГЛ при применении низкодозной ХТ даунорубицином и этопозидом без цитарабина составила 2% всех пациентов, включенных в исследование. Влияние ГЛ на показатели бессобытийной и общей выживаемости проявлялось только при ГЛ с $WBC > 100 \times 10^9/\text{л}$. Возможно, стоит рассмотреть вопрос о начале циторедуктивной химиотерапии при содержании лейкоцитов более $50 \times 10^9/\text{л}$ для всех вариантов ОМЛ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Kalinina I.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0813-5626>
Venyov D.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0183-1530>
Salimova T.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2958-1705>
Petrova U.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1258-8281>
Goronkova O.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8571-5395>
Baidildina D.D. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7130-8596>
Suntcova E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8404-1800>
Evseev D.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8610-0624>
Matveev V.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8709-5238>
Khamin I.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8264-2258>
Dubrovina M.Э. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8228-4876>
Olshanskaya Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>
Zerkalenskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9634-5828>
Mandzhieva A.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4039-430X>
Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>
Shelihova L.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0520-5630>
Maschan M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1735-0093>
Novichkova G.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2322-5734>
Maschan A.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Литература

- Campana D., Pui C.H. Childhood Leukemia. *Abeloff's Clinical Oncology: Fifth Edition* 2013.
- Greenwood M.J., Seftel M.D., Richardson C., Barbaric D., Barnett M.J., Bruyere H., et al. Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006; 47 (7): 1245–52.
- Pastore F., Pastore A., Wittmann G., Hiddemann W., Spiekermann K. The role of therapeutic leukapheresis in hyperleukocytotic AML. *PLoS One*, 2014; 9 (4): e95062.
- Zeller B., Glosli H., Forestier E., Ha S.-Yin, Jahnukainen K., Jónsson Ó.G., et al. Hyperleucocytosis in paediatric acute myeloid leukaemia – the challenge of white blood cell counts above $200 \times 10^9/\text{l}$. *The NOPHO experience 1984–2014*. *Br J Haematol* 2017; Aug; 178 (3): 448–56. DOI: 10.1111/bjh.14692. Epub 2017 May 25.
- Porcu P., Farag S., Marcucci G., Cataland S.R., Kennedy M.S., Bissell M. Leukocytoreduction for acute leukemia. *Ther Apher* 2002 Feb; 6 (1): 15–23.
- Robak T., Wrzesien-Kus A., Lech-Maranda, Kowal E.M., Dmoszynska A. Combination regimen of cladribine (2-Chlorodeoxyadenosine), cytarabine and G-CSF (CLAG) as induction therapy for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000; Sep; 39 (1–2): 121–9.
- Porcu P., Cripe L.D., Ng E.W., Bhatia S., Danielson C.M., Orazi A., McCarthy L.J. Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: A review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leukemia and Lymphoma* 2000; 39 (1–2): 1–18.
- Ganzel C., Becker J., Mintz P.D., Lazarus H.M., Rowe J.M. Hyperleukocytosis, leukostasis and leukapheresis: Practice management. *Blood Rev* 2012; May; 26 (3): 117–22. doi: 10.1016/j.blre.2012.01.003. Epub 2012 Feb 23.
- Röllig C., Ehninger G. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2015 May 21; 125 (21): 3246–52. doi: 10.1182/blood-2014-10-551507. Epub 2015 Mar 16.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 12.11.2019
Принята к печати 23.12.2019

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-18-26

Применение ромиплостима при впервые выявленной иммунной тромбоцитопении у детей

Е.В. Сунцова¹, И.И. Чиквина¹, М.Н. Садовская¹, Н.Н. Коцкая¹, Л.А. Хачатрян¹, Д.Д. Байдильдина¹, И.И. Калинина¹, У.Н. Петрова¹, А.В. Пшонкин¹, И.Я. Лутфуллин², Е.Н. Лемазина², И.В. Осипова², А.В. Галеева², О.С. Наумова², И.В. Фисюн³, Г.В. Быкова⁴, Г.Р. Казарян⁵, А.А. Масчан¹, Г.А. Новичкова¹

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

² ГАУЗ «Городская детская больница № 1», Казань

³ БУЗ Орловской области «Научно-клинический многопрофильный центр медицинской помощи матерям и детям имени З.И. Круглой», Орел

⁴ ГБУЗ Ставропольского края «Краевая детская клиническая больница», Ставрополь

⁵ БУ Ханты-Мансийского АО – Югры «Нижневартовская окружная клиническая детская больница», Нижневартовск

Контактная информация:

Сунцова Елена Викторовна, научный сотрудник отдела депрессий кроветворения, миелоидных лейкозов, редких и наследственных болезней НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: elena.suncova@fccho-moscow.ru

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) – заболевание с гетерогенной клинической картиной. У большинства детей впервые выявленная ИТП является самоограниченным доброкачественным процессом, и хроническая фаза заболевания развивается редко. Клинические проявления в дебюте заболевания сильно различаются: от практически незаметного кожного геморрагического синдрома до тяжелых жизнеугрожающих кровотечений. Общепринятая терапия позволяет достичь тромбоцитарного ответа у большинства пациентов, но у части детей тромбоцитопения оказывается резистентной к проводимой терапии. В статье описан опыт клинического применения ромиплостима у детей с тяжелой резистентной впервые выявленной ИТП. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Тяжесть геморрагического синдрома значимо уменьшалась после начала терапии ромиплостимом во всех случаях. Длительный полный (тромбоциты $> 100 \times 10^9/\text{л}$) тромбоцитарный ответ был достигнут у пяти из шести пациентов через 4–8 недель от начала терапии. После прекращения терапии у троих детей сохраняется ремиссия длительностью от 1 до 3 лет. Нежелательных явлений, связанных с применением ромиплостима, не было отмечено.

Ключевые слова: иммунная тромбоцитопения, ромиплостим, дети

Сунцова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 18–26.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-18-26

Use of romiplostim for newly diagnosed immune thrombocytopenia in children

E.V. Suntsova¹, I.I. Chikvina¹, M.N. Sadovskaya¹, N.N. Kotskaya¹, L.A. Hachatryan¹, D.D. Baydildina¹, I.I. Kalinina¹, U.N. Petrova¹, A.V. Pshonkin¹, I.Ya. Lutfullin², E.N. Lemazina², I.V. Osipova², A.V. Galeeva², O.S. Naumova², I.V. Fisyn³, G.V. Bikova⁴, G.R. Kazaryan⁵, A.A. Maschan¹, G.A. Novichkova¹

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

² Regional Children's Hospital, Kazan

³ Scientific and Clinical Multidisciplinary Center for Help for Mothers and Children named after Z.I. Kruglaya, Oryol

⁴ Regional Children's Hospital, Stavropol

⁵ Regional Children's Hospital, Nizhnevartovsk

Immune thrombocytopenia (ITP) is a disease with a heterogeneous clinical manifestation. In the majority of children newly diagnosed ITP is a self-limited benign disorder, while chronic ITP develops rarely. The clinical onset of ITP can occur in very different ways: from nearly invisible skin hemorrhage to severe life-threatening bleeding. Conventional treatments promote a response in most patients, but in a small number of children thrombocytopenia is unresponsive. In this article, we describe our experience of the clinical use of romiplostim in children with severe unresponsive newly diagnosed ITP. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The severity of bleeding decreased significantly after the start of romiplostim therapy in all cases. Durable complete (platelets $> 100 \times 10^9/\text{l}$) response was achieved in five out of six patients 4 to 8 weeks after starting therapy. Three children have remained in lasting remission for 1 to 3 years after the discontinuation of romiplostim. There were no adverse events associated with romiplostim.

Key words: immune thrombocytopenia, romiplostim, children

Suntsova E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 18–26.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-18-26

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 12.11.2019
Accepted 23.12.2019

Correspondence:

Elena V. Suntsova, MD, Department of hematopoiesis depressions, myeloid leukemias, rare and inherited diseases, 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: elena.suncova@fccho-moscow.ru

Первичная иммунная тромбоцитопения (ИТП) – аутоиммунное заболевание, которое характеризуется изолированным транзиторным или персистирующим снижением числа тромбоцитов и проявляется геморрагическим синдромом

различной степени тяжести [1]. Согласно современным представлениям ИТП ассоциирована не только с усиленной иммуноопосредованной деструкцией тромбоцитов, но является также результатом нарушенной продукции тромбоцитов из мегакарио-

цитов в костном мозге [2–4]. В отличие от взрослых, у детей ИТП в большинстве случаев (60–75%) развивается остро и разрешается в течение нескольких дней или недель от начала заболевания вне зависимости от проведения специфической терапии [5, 6]. Другая отличительная черта ИТП у детей – низкая частота развития тяжелой жизнеугрожающей кровоточивости: в среднем частота развития тяжелых (3–4-й степени по шкале ВОЗ [2]) кровотечений – носовых, желудочно-кишечных, маточных – составляет около 3–5%, а частота развития внутричерепных кровоизлияний – около 0,2–0,9% [2, 5]. Между числом тромбоцитов и риском кровотечений имеется очевидная корреляция: приблизительно 75% эпизодов кровоточивости развивается при числе тромбоцитов менее $10 \times 10^9/\text{л}$ [2].

Принимая во внимание эти особенности, многие авторитеты рекомендуют при впервые выявленной ИТП, не сопровождающейся выраженным геморрагическим синдромом, придерживаться тактики наблюдения («*watch and wait*»). В случаях тяжелого течения заболевания, которое характеризуется, в первую очередь, признаками клинически значимой кровоточивости на фоне тромбоцитопении менее $20\text{--}30 \times 10^9/\text{л}$, терапией 1-й линии для детей остаются внутривенные иммуноглобулины (ВВИГ) в курсовой дозе 1–2 г/кг массы тела и глюкокортикостероиды (ГКС) в стандартной дозе 1–2 мг/кг/сут в эквиваленте преднизолона в течение 2–4 недель с постепенной отменой. Вероятность нормализации и значимого повышения числа тромбоцитов при применении ВВИГ и ГКС одинакова – около 70–90% [2, 3, 5–7].

Вместе с тем в клинической практике регулярно встречаются случаи тяжелого дебюта ИТП с симптомами кровоточивости и/или повышенной угрозой развития кровотечений на фоне экстремально низкого числа тромбоцитов, которые резистентны к препаратам 1-й линии. Обычно в подобных случаях применяют повторные курсы высоких доз ГКС (дексаметазон, метилпреднизолон) или комбинированную терапию ВВИГ + ГКС. Иногда с целью купирования тяжелых кровотечений используют заместительные трансфузии тромбоконцентрата [2]. Эти меры могут помочь временно купировать эпизод кровотечения, но не позволяют достичь стабильного тромбоцитарного ответа. Кроме того, длительная терапия ГКС может быть сопряжена с множеством нежелательных эффектов.

Препараты второй и последующих линий терапии ИТП используют с целью повышения числа тромбоцитов у пациентов с хронической ИТП (> 12 мес. от начала заболевания) или, по крайней мере, при длительности заболевания более 6 мес. Спленэктомия у детей выполняется гораздо реже, чем у взрослых, и практически никогда не рассматривается

в качестве варианта терапии в первые месяцы заболевания. В целом при ИТП у детей в подавляющем большинстве случаев терапевтический выбор делают в пользу медикаментозного лечения, особенно в последнее время, когда список возможных вариантов консервативного лечения расширился за счет появления в клинической практике агонистов тромбоцетиновых рецепторов (ТПО-РА) [1–3].

Лечебный эффект ТПО-РА при ИТП связан с ингибированием апоптоза клеток-предшественников и усилением тромбоцитопоэза путем стимуляции специфических ТПО-рецепторов на мегакариоцитах костного мозга, что приводит к повышению количества циркулирующих в крови тромбоцитов без иммуносупрессивного действия, присущего всем остальным препаратам, применяющимся в лечении ИТП [8]. Многочисленные публикации посвящены результатам исследований ТПО-РА (ромиплостима и элтромбопага) при тяжелой хронической ИТП или длительности заболевания более 6 мес. как у взрослых [9–12], так и у детей [13–16]. По результатам рандомизированных клинических исследований применение ТПО-РА приводит к повышению числа тромбоцитов у большинства пациентов, снижает частоту и тяжесть кровотечений у пациентов с тяжелым хроническим течением ИТП, которые не достигли тромбоцитарного ответа после применения стандартной терапии, в том числе после спленэктомии [17, 18]. Кроме того, у многих реципиентов ТПО-РА удается отменить все остальные иммуносупрессивные препараты, используемые для повышения числа тромбоцитов. Единичные сообщения описывают результаты применения ТПО-РА при впервые выявленной (острой) ИТП при резистентности к препаратам 1-й линии [19, 20]. Опубликованных данных о применении ромиплостима у детей в возрасте до 1 года мы не нашли. В педиатрической клинической практике ТПО-РА обычно рассматривают как вариант консервативной терапии при тяжелой хронической ИТП. Применение ТПО-РА при затяжной фазе ИТП, а тем более в первые 3 мес. от начала заболевания, обсуждается нечасто.

В настоящей статье представлен опыт применения ромиплостима у детей с тяжелой ИТП, резистентной к терапии 1-й линии, в первые 3 мес. от начала заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Мы проанализировали истории болезни 157 пациентов с диагнозом «иммунная тромбоцитопения», находившихся на обследовании и лечении в НМИЦ ДГОИ

им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Сбор анамнеза проводили согласно представленным выписным эпикризам. Всем пациентам выполняли обязательные исследования, необходимые для диагностики ИТП [1]. Дополнительные обследования проводили по индивидуальным показаниям. Диагноз и фазу ИТП (впервые выявленная, затяжная, хроническая) устанавливали на основании общепринятых критериев [1].

В анализируемой группе наибольшее количество составили пациенты с хроническим и затяжным (> 3 мес.) течением заболевания (n = 129); у остальных ИТП была впервые выявлена, длительность заболевания составляла менее 3 мес. (n = 28). Среди пациентов с впервые выявленной ИТП двое не получали специфическую терапию в связи с нетяжелым течением тромбоцитопении; еще у одного ребенка была зарегистрирована спонтанная нормализация числа тромбоцитов. Остальные дети получали общепринятую терапию 1-й линии с применением только ВВИГ (n = 3) или ВВИГ + ГКС (n = 22); у 18 из них был достигнут оптимальный тромбоцитарный ответ и купирован геморрагический синдром, а у 7 пациентов ИТП характеризовалась тяжелым течением и резистентностью к препаратам 1-й линии. Часть детей с резистентным течением заболевания в ходе дальнейшей терапии получала агонист тромбопоэтиновых рецепторов – ромиплостим. Решение о начале терапии ТПО-РА для каждого пациента принимали индивидуально.

Критерием для начала терапии было тяжелое, требующее постоянной медикаментозной терапии течение заболевания в сочетании с резистентностью или достижением лишь частичного крайне непродолжительного (3–7 дней) тромбоцитарного ответа при применении терапии 1-й линии (повторные курсы ВВИГ и ГКС). Родители всех пациентов подписали письменное информированное согласие на проведение лечения.

Мы провели ретроспективное исследование переносимости, эффективности и токсичности ромиплостима в данной небольшой группе пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего терапию ромиплостимом при впервые выявленной ИТП получили 6 детей в возрасте от 3 мес. до 7 лет, в том числе 5 мальчиков и одна девочка. Длительность ИТП во всех случаях составляла менее 3 мес. В трех случаях вероятным триггером заболевания были профилактические вакцинации, в остальных – перенесенные вирусные инфекции, в двух случаях (пациенты № 1 и № 3) подтвержденные методом ПЦР, – парвовирусная и цитомегаловирусная (ЦМВ). Пациентка с ЦМВ получила терапию ганцикловиром.

До начала терапии количество тромбоцитов у пациентов составляло $1-7 \times 10^9/\text{л}$. У троих детей отмечали клинически значимые кровотечения; у остальных детей в возрасте 3–5 мес. – экстремальную тромбоцитопению и кожный геморрагический синдром. Демографические данные пациентов и характеристики ИТП представлены в *таблице*.

Ромиплостим был назначен 5 пациентам – инициально в максимальной дозе 10 мкг/кг/нед.; одному ребенку дозу повышали постепенно. Общая длительность терапии составила от 5 до 38 нед. Помимо ромиплостима, двое детей дополнительно получали комбинированную терапию: ГКС + ритуксимаб (пациент № 1) и ВВИГ (множественные повторные курсы) + ГКС + ритуксимаб (пациент № 2); одна (пациент № 3) нуждалась в заместительных трансфузиях тромбоконцентратом; один (пациент № 4) получал ромиплостим в комбинации с ВВИГ и тромбоконцентратом на первой неделе терапии; одному ребенку после начала терапии ромиплостимом дополнительная терапия не потребовалось (пациент № 5); одному (пациент № 6) дополнительно потребовался курс ВВИГ.

За время лечения у 5 из 6 пациентов был достигнут полный стабильный тромбоцитарный ответ (число тромбоцитов $> 100 \times 10^9/\text{л}$). Интервал до достижения ответа составил 4–8 нед. Длительность наблюдения за пациентами в этой группе – от 1,5 мес. до 3 лет. У 3 пациентов полный ответ сохраняется после отмены ромиплостима в течение 1; 2 и 3 лет соответственно; один пациент продолжает получать ромиплостим; одна пациентка с достигнутым ответом потеряна для длительного наблюдения. Пациент, не достигший стабильного ответа на комбинированную терапию, продолжил получать ВВИГ «по требованию»; через 20 мес. от начала заболевания ему успешно выполнили спленэктомию.

Тяжесть геморрагического синдрома после начала терапии ромиплостимом во всех случаях значительно уменьшалась. За период наблюдения в исследуемой группе пациентов нежелательных явлений, связанных с применением ТПО-РА, не отмечено. Динамика числа тромбоцитов во время проведении терапии представлена на *рисунке*.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ (пациент № 5)

Мальчик рожден от второй беременности, вторых срочных родов путем кесарева сечения с нормальными массо-ростовыми показателями. При выписке из роддома число тромбоцитов составляло $275 \times 10^9/\text{л}$. В возрасте 2 мес. ребенку проведена вакцинация против вирусного гепатита В и пневмококка. Через 2 нед. ребенок был госпитализирован в стационар по месту жительства в связи с жалобами на появ-

Таблица

Демографические данные пациентов и характеристики иммунной тромбоцитопении

Table

Patient's demographic data and characteristics of Immune thrombocytopenia

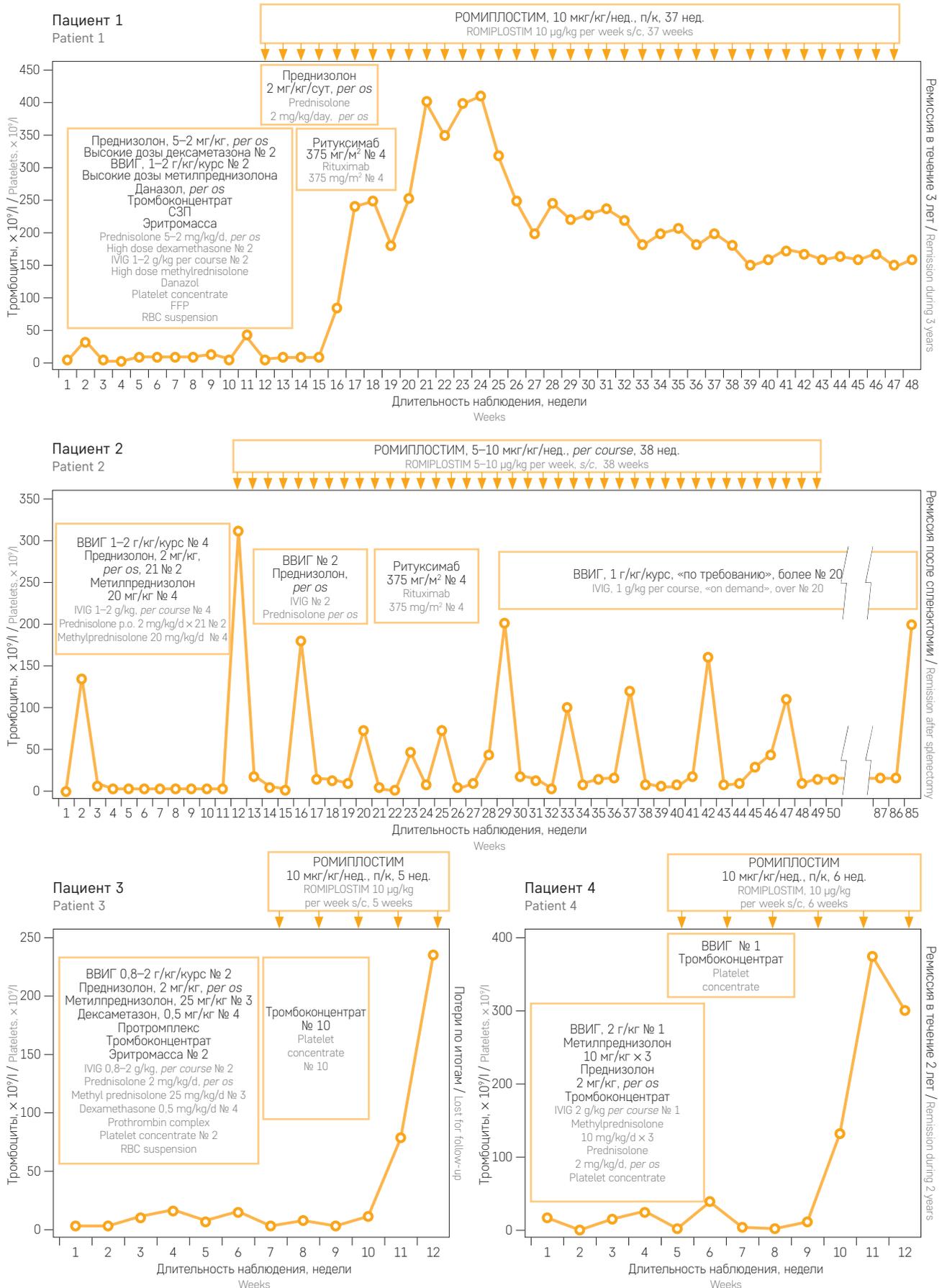
№	Пол Gender	Возраст Age	Длительность ИТП Duration of ITP	Геморрагический синдром Hemorrhagic syndrome	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{l}$	Предшествующая терапия Previous treatment	Доза ромиплостима, мкг Dosage of romiplostim, μg	Длительность терапии ромиплостимом Duration of therapy with romiplostim	Дополнительная терапия Concomitant therapy	Результат Result
№1	М М	7 лет 7 years	11 недель 11 weeks	Кожный, носовые и ЖКТ кровотечения, макрогематурия (2–3 ст.) Cutaneous, nasal and gastrointestinal tract bleeding, hematuria (gr. 2–3)	7	ВВИГ № 2 Преднизолон, <i>per os</i> Дексаметазон № 2 Метилпреднизолон Даназол Тромбоконцентрат СЗП Эритромаасса IVIГ № 2 Prednisolone <i>per os</i> Dexamethasone № 2 Methylprednisolone Danazol Platelet concentrate FFP RBC suspension	10	37 недель 37 weeks	Преднизолон Ритуксимаб Prednisolone Rituximab	Ответ через 4 нед., ремиссия 3 года Response in 4 weeks, remission during 3 years
№2	М М	2 года 2 years	11 недель 11 weeks	Кожный, носовые кровотечения (2 ст.) Cutaneous, epistaxis (gr. 2)	5	ВВИГ № 4 Метилпреднизолон Преднизолон, <i>per os</i> № 2 IVIГ № 4 Methylprednisolone Prednisolone <i>per os</i> № 2	5–10	38 недель 38 weeks	ВВИГ > № 20 курсов Преднизолон <i>per os</i> Ритуксимаб IVIГ > № 20 курсов Prednisolone <i>per os</i> Rituximab	Ремиссия после спленэктомии Remission after splenectomy
№3	Д Ф	4 мес. 4 months	7 недель 7 weeks	Кожный, слизистый, кровотечения из мест инъекций, ЖКТ (3 ст.) Cutaneous, mucosal, gastrointestinal tract and bleeding from injection sites (gr. 3)	4	ВВИГ № 2 Преднизолон, <i>per os</i> Метилпреднизолон Дексаметазон Протромбиновый комплекс Тромбоконцентрат Эритромаасса IVIГ № 2 Prednisolone <i>per os</i> Methylprednisolone Dexamethasone Prothrombin complex Platelet concentrate RBC suspension	10	5 недель 5 weeks	Тромбоконцентрат Platelet concentrate	Ответ через 4 нед., потеряна для наблюдения с ответом Response in 4 weeks; lost for follow-up with response
№4	М М	5 мес. 5 months	5 недель 5 weeks	Кожный Cutaneous	3	ВВИГ Метилпреднизолон Преднизолон, <i>per os</i> Тромбоконцентрат IVIГ Methylprednisolone Prednisolone <i>per os</i> Platelet concentrate	10	6 недель 6 weeks	ВВИГ Тромбоконцентрат IVIГ Platelet concentrate	Ответ через 6 нед., ремиссия 2 года Response in 6 weeks, remission during 2 years
№5	М М	3 мес. 3 months	8 недель 8 weeks	Кожный Cutaneous	1	ВВИГ № 3 Преднизолон, <i>per os</i> Метилпреднизолон № 2 Тромбоконцентрат IVIГ № 3 Prednisolone <i>per os</i> Methylprednisolone № 2 Platelet concentrate	10	21 неделя 21 weeks	Не было No	Ответ через 4 нед., ремиссия 1 год Response in 4 weeks; remission during 1 year
№6	М М	3 мес. 3 months	6 недель 6 weeks	Кожный Cutaneous	1	ВВИГ № 3 Преднизолон, <i>per os</i> Метилпреднизолон Тромбоконцентрат IVIГ № 3 Prednisolone <i>per os</i> Methylprednisolone Platelet concentrate	10	30 недель 30 weeks	ВВИГ IVIГ	Ответ через 8 нед., терапия продолжается Response in 8 weeks, therapy continues

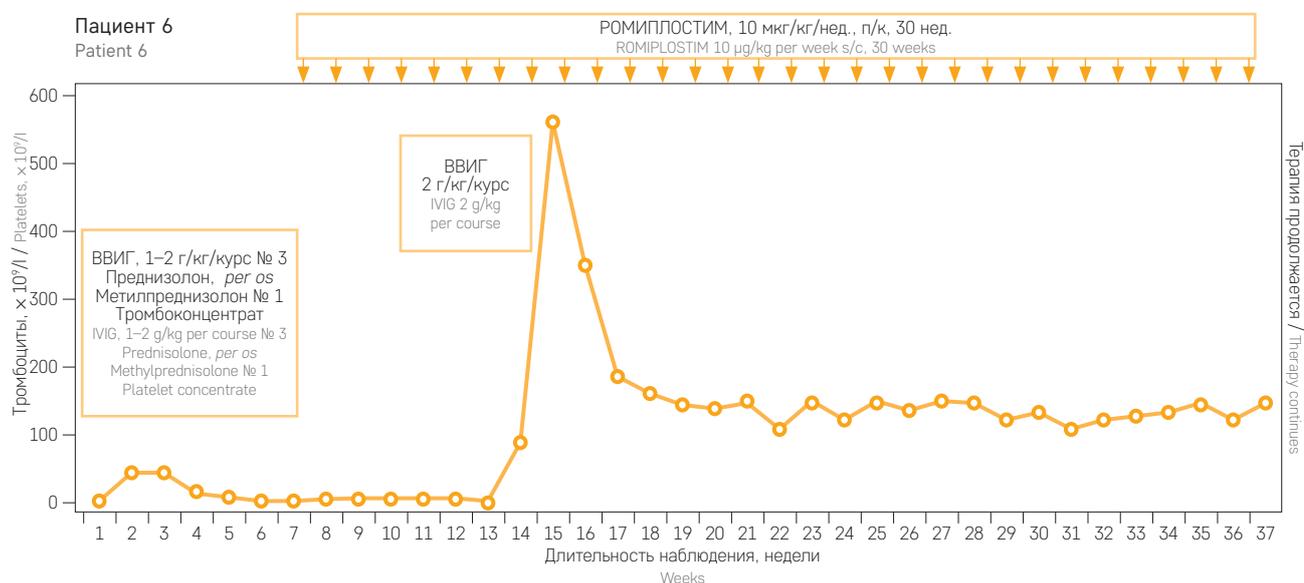
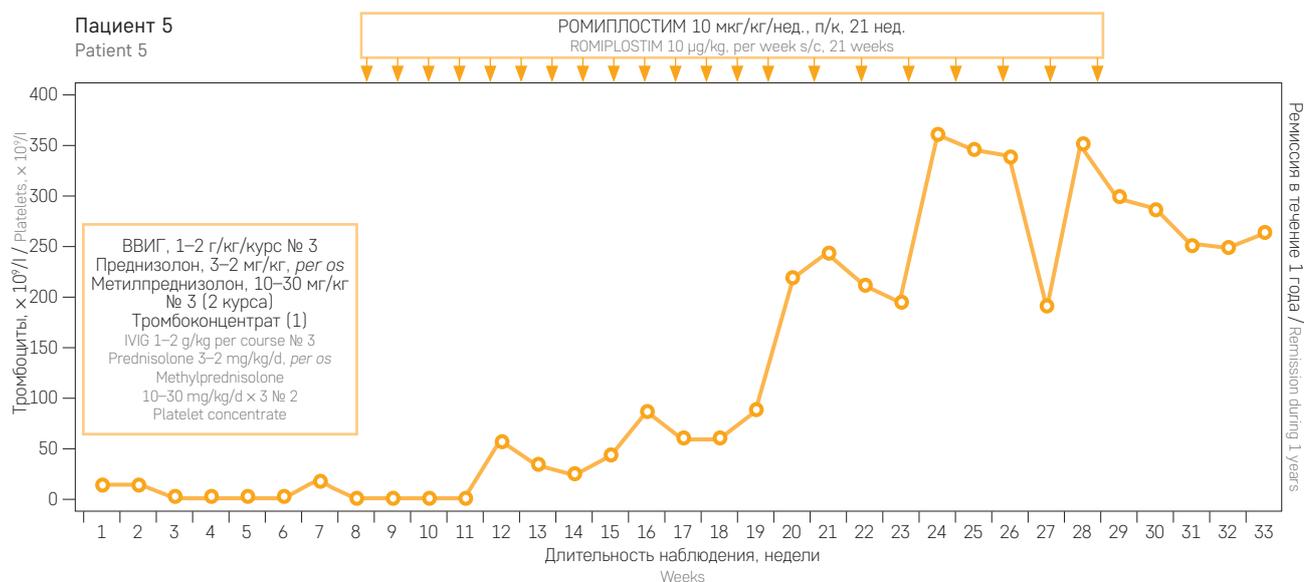
Рисунок

Динамика числа тромбоцитов у пациентов во время терапии

Figure

Dynamics of platelet count in patients during therapy





ление мелкоочечной геморрагической сыпи на коже с тенденцией к быстрому распространению и развитием кровоизлияний в слизистую оболочку верхнего неба. Других физикальных особенностей во время осмотра не отмечено. При лабораторном обследовании в общем анализе крови выявлена изолированная тромбоцитопения (лейкоциты – $7,2 \times 10^9/l$; нейтрофилы – 25%; лимфоциты – 69%; моноциты – 6%; гемоглобин – 123 г/л; тромбоциты – $5 \times 10^9/l$).

По данным других обследований: биохимический анализ крови – все исследованные показатели в пределах возрастной нормы; инфекционный скрининг – ВИЧ, гепатиты, ПЦР ЦМВ, ЭБВ, герпес не обнаружены; уровень сывороточных иммуноглобулинов до начала терапии ВВИГ не определялся; миелограмма – костный мозг умеренно гипоклеточный, полиморфный, мегакариоциты (МКЦ) представлены в достаточном количестве. Таким образом, на основании данных анамнеза, физикального осмотра и лабораторных обследований был установлен

диагноз «иммунная тромбоцитопения, впервые выявленная». Учитывая возраст ребенка, крайне низкое число тромбоцитов и нарастающий кожно-слизистый геморрагический синдром, состояние расценено как тяжелое. В соответствии с общепринятыми рекомендациями ведения пациентов с впервые выявленной ИТП принято решение о начале терапии. Терапию 1-й линии ИТП: ВВИГ в курсовой дозе 2 г/кг; метилпреднизолон – 10 мг/кг, № 3; преднизолон – 2 мг/кг, *per os*, 21 день; повторный курс: ВВИГ – 1 г/кг; метилпреднизолон – 30 мг/кг, № 3, проводили в течение 8 нед., без эффекта; число тромбоцитов оставалось низким (*max* – до $19 \times 10^9/l$), геморрагический синдром уменьшался лишь временно.

Учитывая отсутствие тромбоцитарного ответа после проведения повторных курсов терапии 1-й линии, состояние было расценено как резистентное течение ИТП. По результатам проведенного исследования выявлена нормальная экспрессия белка WASP. Начата терапия агонистами ТПО-ре-

цепторов (выполнена первая инъекция ромиплостима в дозе 10 мкг/кг). С целью поиска возможных альтернативных причин тромбоцитопении продолжили обследование. При повторном исследовании миелограммы: пунктаты со сниженной клеточностью, полиморфны по составу, бласты 5–6% различных линий дифференцировки, мегакариоцитарный росток расширен, единичные МКЦ со скудной отшнуровкой тромбоцитов; при морфологическом исследовании мазка крови описаны крупные формы тромбоцитов; по данным УЗ-исследования и КТ органов брюшной полости патологии не выявлено.

Кровь пациента была направлена на молекулярно-генетическое исследование для исключения возможного дебюта других первичных иммунодефицитных состояний, синдромов врожденной костномозговой недостаточности или врожденных форм тромбоцитопении. В связи с отсутствием даже временного тромбоцитарного ответа на проводимую терапию ВВИГ и ГКС и сохранение клинически значимого геморрагического синдрома было принято решение о продолжении терапии ромиплостимом в дозе 10 мкг/кг в неделю. Через 4 нед. от начала терапии ромиплостимом число тромбоцитов достигло $50 \times 10^9/\text{л}$, геморрагический синдром постепенно разрешился. Потребности в проведении дополнительной терапии ВВИГ и ГКС с момента начала терапии ромиплостимом не было. Пациента выписали под амбулаторное наблюдение. В общем анализе крови поддерживалось число тромбоцитов не менее $200 \times 10^9/\text{л}$, в связи с этим было решено постепенно уменьшать кратность введения ромиплостима (через 10 дней, затем через 14 дней) под контролем числа тромбоцитов. Терапия ромиплостимом была полностью остановлена через 21 нед. Ребенок находится в ремиссии заболевания без терапии более одного года. По результатам генетических исследований специфических мутаций не обнаружено, диагноз ИТП подтвержден.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИТП – заболевание с достаточно гетерогенной клинической картиной. Несмотря на то что у большинства детей это заболевание имеет благоприятный прогноз и тромбоцитопения разрешается в течение первых месяцев болезни, часть пациентов (23,1–47,3%) страдает от тромбоцитопении более 6 мес., а 10–20% – более 12 мес. [5, 21]. Клинические проявления в дебюте заболевания также могут сильно отличаться – от практически незаметного кожного геморрагического синдрома до тяжелых кровотечений. Риск развития жизнеугрожающих кровотечений у детей в целом оценивается как низкий, но предсказать вероятность развития тяжелой кровоте-

чивости в каждой клинической ситуации достаточно сложно. При этом яркий геморрагический синдром в дебюте ИТП у детей младшего возраста – один из критериев благоприятного исхода заболевания [6]. Ответ на проводимую терапию тоже вариателен, а у некоторых пациентов тромбоцитопения оказывается резистентной к общепринятой терапии. Истинная резистентность ИТП к препаратам 1-й линии, вероятно, связана с различными патогенетическими механизмами развития этого заболевания [21, 22]. Вместе с тем не следует забывать, что ИТП остается диагнозом исключения; во всех случаях отсутствия ответа на ИТП-специфическую терапию рекомендуется проведение дополнительного обследования с целью исключения возможных альтернативных причин тромбоцитопении [5, 23]. Выбор терапевтической тактики в случаях резистентности неоднозначен. Учитывая, что у большинства детей ИТП имеет благоприятный прогноз, слишком агрессивная тактика терапии не всегда оправдана. В связи с этим в случаях тяжелого дебюта ИТП в сочетании с резистентностью к общепринятой терапии 1-й линии привлекательными выглядят альтернативные безопасные терапевтические подходы, например, более раннее назначение ТПО-РА [19].

В представленной группе пациентов впервые выявленная ИТП характеризовалась признаками тяжелой кровоточивости или повышенным риском ее развития на фоне экстремально низкого числа тромбоцитов. При этом не было отмечено сколько-нибудь продолжительного ответа на общепринятую терапию. В качестве дальнейшего консервативного лечения с целью повышения числа тромбоцитов до безопасных значений шести детям была инициирована терапия с применением ромиплостима. Учитывая необходимость быстрого достижения безопасного значения числа тромбоцитов, практически во всех случаях препарат изначально назначали в дозе 10 мкг/кг. Несмотря на применение максимальных доз, все дети переносили терапию удовлетворительно; нежелательных явлений, связанных с применением ромиплостима, не зафиксировано. В одном случае при совместном назначении с ВВИГ отмечен однократный эпизод тромбоцитоза ($> 400 \times 10^9/\text{л}$). В большинстве случаев удовлетворительный тромбоцитарный ответ, которого ранее не удавалось достичь при применении стандартной терапии, был получен в среднем в течение 4 нед. Принимая во внимание, что большинство пациентов получало не монотерапию ромиплостимом, а комбинированную терапию, достоверно оценить эффективность ромиплостима можно не во всех случаях. Тем не менее у большинства детей был получен стабильный ответ, которого ранее не удавалось достичь на стандартной терапии, а у некоторых – ремиссия ИТП (> 6 мес. без терапии). Возможно,

такой эффект можно объяснить спонтанным восстановлением количества тромбоцитов, а применение ТПО-РА лишь позволило дождаться отсроченного ответа.

В данной группе курс ромиплостима оказался менее продолжительным, в отличие от случаев клинического применения ТПО-РА при хронической ИТП у детей, когда терапию приходится продолжать годами. Кроме того, у 5 пациентов, четверо из которых были в возрасте до 1 года, одновременно с началом терапии ромиплостимом продолжался дифференциально-диагностический поиск с целью исключения других возможных причин тромбоцитопении. Поскольку изолированная тромбоцитопения у детей нередко может быть дебютом врожденных синдромов костномозговой недостаточности, приобретенной аплазии кроветворения и первичных иммунодефицитных состояний, при которых длительное применение ГКС может привести к инфекционным осложнениям, это стало дополнительным аргументом в пользу выбора терапии препаратами, не обладающими иммуносупрессивным действием. Во всех проанализированных случаях альтернативные причины тромбоцитопении не выявлены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ромиплостим – агонист тромбопозитиновых рецепторов – безопасный вид консервативной терапии, который может эффективно повышать число тромбоцитов до безопасного значения не только при хронической ИТП, но и в ранней фазе заболевания при резистентности к общепринятой терапии. С одной стороны, применение ромиплостима при впервые выявленной фазе заболевания позволяет избежать назначения длительной иммуносупрессивной терапии или отодвинуть ее на более поздние сроки, когда

заболевание станет хроническим; в ряде случаев можно дождаться отсроченного восстановления количества тромбоцитов; с другой стороны – может обеспечить более безопасный период ожидания результатов дообследований, необходимых для исключения альтернативных причин тромбоцитопении и принятия решения о дальнейшей тактике терапии.

Для детей с тяжелой впервые выявленной ИТП, с кровоточивостью или непредсказуемой угрозой развития кровотечений на фоне экстремальной тромбоцитопении в сочетании с резистентностью к общепринятой терапии, клинически оправдано краткосрочное применение препарата из группы ТПО-РА, ромиплостима.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Suntsova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8404-1800>
Chikvina I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5067-8288>
Sadovskaya M.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7918-680X>
Kotskaya N.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2787-6005>
Hachtryan L.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7265-0414>
Baydildina D.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7130-8596>
Kalinina I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5626>
Petrova U.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1258-8281>
Pshonkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>
Lutfullin I.Ya. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0224-2746>
Lemazina E.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6569-6390>
Osipova I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9833-5156>
Galeeva A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7527-9507>
Naumova O.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6929-7338>
Fisyun I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9050-7822>
Bikova G.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6552-4257>
Kazaryan G.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1881-7444>
Maschan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>
Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Литература

- Rodeghiero F., Stasi R., Gernsheimer T., Michel M., Provan D., Arnold D.M., et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009 Mar 12; 113 (11): 2386–93.
- Provan D., Stasi R., Newland A.C., Blanchette V.S., Bolton-Maggs P., Bussel J.B., et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010 Jan 14; 115 (2): 168–86.
- Масчан А.А., Румянцев А.Г. Иммунная тромбоцитопения у детей: от консенсуса в терминологии к консенсусу в лечении. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунологии в педиатрии* 2010; 1: 5–13.
- Nugent D., McMillan R., Nichol J.L., Slichter S.J. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased platelet destruction and/or decreased platelet production. *Br J Haematol* 2009 Sep; 146 (6): 585–96.
- Nugent D.J. Immune thrombocytopenic purpura of childhood. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 97–103.
- Blanchette V.S., Carcao M. Childhood acute immune thrombocytopenic purpura: 20 years later. *Semin Thromb Hemost* 2003 Dec; 29 (6): 605–17.
- Beck C.E., Nathan P.C., Parkin P.C., Blanchette V.S., Macarthur C. Corticosteroids versus intravenous immune globulin for the treatment of acute immune thrombocytopenic purpura in children: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2005 Oct; 147 (4): 521–7.

8. Kuter D.J. The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. *Int J Hematol* 2013 Jul; 98 (1): 10–23.
9. Bussel J.B., Kuter D.J., Pullarkat V., Lyons R.M., Guo M., Nichol J.L. Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. *Blood* 2009 Mar 5; 113 (10): 2161–71.
10. Khellaf M., Michel M., Quittet P., Viallard J.F., Alexis M., Roudot-Thoraval F., et al. Romiplostim safety and efficacy for immune thrombocytopenia in clinical practice: 2-year results of 72 adults in a romiplostim compassionate-use program. *Blood* 2011 Oct 20; 118 (16): 4338–45.
11. Bussel J.B., Cheng G., Saleh M.N., Psaila B., Kovaleva L., Meddeb B., et al. Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2007 Nov 29; 357 (22): 2237–47.
12. Saleh M.N., Bussel J.B., Cheng G., Meyer O., Bailey C.K., Arning M., Brainzsky A. EXTEND Study Group. Safety and efficacy of eltrombopag for treatment of chronic immune thrombocytopenia: results of the long-term, open-label EXTEND study. *Blood* 2013 Jan 17; 121 (3): 537–45.
13. Bussel J.B., Buchanan G.R., Nugent D.J., Gnarra D.J., Bomgaars L.R., Blanchette V.S., et al. A randomized, double-blind study of romiplostim to determine its safety and efficacy in children with immune thrombocytopenia. *Blood* 2011; 118: 28–36.
14. Bussel J.B., Hsieh L., Buchanan G.R., Stine K., Kalpathi R., Gnarra D.J., et al. Long-term use of the thrombopoietin-mimetic romiplostim in children with severe chronic immune thrombocytopenia (ITP). *Pediatr Blood Cancer* 2015 Feb; 62 (2): 208–13.
15. Bussel J.B., de Miguel P.G., Despotovic J.M., Grainger J.D., Sevilla J., Blanchette V.S., et al. Eltrombopag for the treatment of children with persistent and chronic immune thrombocytopenia (PETIT): a randomised, multicentre, placebo-controlled study. *Lancet Haematol* 2015; 2: e315–25.
16. Grainger J.D., Locatelli F., Chotsampancharoen T., Donyush E., Pongtanakul B., Komvilaisak P., et al. Eltrombopag for children with chronic immune thrombocytopenia (PETIT2): a randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015; 386: 1649–58.
17. Kuter D.J., Bussel J.B., Lyons R.M., Pullarkat V., Gernsheimer T.B., Senecal F.M., et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2008 Feb 2; 371 (9610): 395–403.
18. Cheng G., Saleh M.N., Marcher C., Vasey S., Mayer B., Aivado M., et al. Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet* 2011 Jan 29; 377 (9763): 393–402.
19. Neunert C., Despotovic J., Haley K., Lambert M.P., Nottage K., Shimano K., et al. Pediatric ITP Consortium of North America (ICON). Thrombopoietin receptor agonist use in children: data from the pediatric ITP consortium of North America ICON2 study. *Pediatr Blood Cancer* 2016 Aug; 63 (8): 1407–13.
20. Kuter D.J., Newland A., Chong B.H., Rodeghiero F., Romero M.T., Pabinger I., et al. Romiplostim in adult patients with newly diagnosed or persistent immune thrombocytopenia (ITP) for up to 1 year and in those with chronic ITP for more than 1 year: a subgroup analysis of integrated data from completed romiplostim studies. *Br J Haematol* 2019 May; 185 (3): 503–13.
21. Neunert C., Lim W., Crowther M., Cohen A., Solberg L.Jr., Crowther M.A. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011 Apr 21; 117 (16): 4190–207.
22. Consolini R., Legitimo A., Caparello M.C. The Centenary of Immune Thrombocytopenia – Part 1: Revising Nomenclature and Pathogenesis. *Front Pediatr* 2016 Oct 19; 4: 102.
23. Сунцова Е.В., Байдильдина Д.Д., Калинина И.И., Петрова У.Н., Пшонкин А.В., Хачатрян Л.А. и др. Спектр дифференциальной диагностики иммунной тромбоцитопении у детей. *Педиатрия* 2019; 98 (4): 62–71/

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34

Наблюдение функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo* у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией

Д.С. Морозова¹, А.А. Мартыанов^{1, 2, 3, 4}, М.А. Пантелеев^{1, 2, 4}, П.А. Жарков²,
Д.В. Федорова², А.Н. Свешникова^{1, 2, 4}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

³ ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, Москва

⁴ ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

ANKRD26-ассоциированная тромбоцитопения – это несиндромальная наследственная тромбоцитопения, для которой не существует формальных диагностических критериев по функциональным тестам. Известно, что при патогенетических вариантах в гене *ANKRD26* значительно возрастает вероятность миелоидных лейкозов, однако исследований функционирования гранулоцитов при этой патологии не проводили. Цель данного исследования – анализ функционирования гранулоцитов и тромбоцитов при тромбообразовании *ex vivo* у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией. В исследовании были включены два пациента и 10 здоровых добровольцев. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Внутриклеточная сигнализация и функциональные ответы тромбоцитов наблюдались методом непрерывной проточной цитометрии; тромбообразование *ex vivo* и функционирование гранулоцитов – на флуоресцентном микроскопе в плоско-параллельных проточных камерах, содержащих фибриллярный коллаген. При физиологической (АДФ, аналог коллагена) активации тромбоцитов пациентов *in vitro* не отмечено значимых их отличий от тромбоцитов здоровых доноров. При этом наблюдаемый *ex vivo* размер тромбов был значительно снижен по сравнению со здоровыми донорами и литературными данными о пациентах с другими тромбоцитопениями. Наблюдаемое количество и активность (скорость перемещения) гранулоцитов пациентов были в пределах нормальных значений. Однако гранулоциты пациентов имели значительные морфологические отличия по сравнению с гранулоцитами здоровых доноров, а именно повышенную распластанность (в частности, большое количество тонких псевдоподий), а также повышенную кривизну траекторий движения. При *ex vivo* наблюдении тромбообразования у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией наблюдается значительно уменьшенный размер тромбов при нормальной активности тромбоцитов и повышенной изменчивости формы гранулоцитов.

Ключевые слова: гранулоциты, нейтрофилы, тромбоциты, *ANKRD26*, флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия

Морозова Д.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 27–34.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34

Observation of granulocyte function during *ex vivo* thrombus formation for patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia

D.S. Morozova¹, A.A. Martyanov^{1, 2, 3, 4}, M.A. Panteleev^{1, 2, 4}, P.A. Zharkov², D.V. Fedorova², A.N. Sveshnikova^{1, 2, 4}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow
² Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

³ Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴ Centre for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow

ANKRD26-associated thrombocytopenia is a non-syndromic hereditary thrombocytopenia for which there are currently no formal diagnostic criteria. It is known that the probability of myeloid leukemia in patients with pathogenetic variants in the *ANKRD26* gene significantly increases, however, studies of the functioning of granulocytes in this pathology have not been conducted. Aims: Analysis of the functioning of granulocytes and platelets during *ex vivo* thrombosis in patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. Two patients and 10 healthy volunteers were included in the study. Intracellular signaling and platelet functional responses were observed by continuous flow cytometry. *Ex vivo* thrombus formation and granulocyte functioning were observed on a fluorescence microscope in parallel-plane flow chambers containing fibrillar collagen. Upon physiological activation (ADP, collagen) of patients' platelets *in vitro*, there were no significant differences between the platelets of patients and healthy donors. However, the observed *ex vivo* size of platelet aggregates was significantly reduced in comparison with healthy donors and published data on patients with other thrombocytopenias. The observed number and activity (movement velocity) of granulocytes of patients was within normal values. However, significant morphological differences were observed for granulocytes of patients compared with granulocytes of healthy donors: there was an increased spreading of granulocytes, in particular, expressed in a large number of thin pseudopodia, as well as an increased curvature of the motion trajectories of granulocytes. *Ex vivo* observation of thrombus formation in patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia, a significantly reduced thrombus size is observed with normal platelet activity and increased variability in the shape of granulocytes.

Key words: granulocytes, neutrophils, platelets, *ANKRD26*, fluorescence microscopy, flow cytometry

Morozova D.S., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2020; 19 (1): 27–34.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 11.01.2020

Принята к печати 17.02.2020

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 Mashela, 1
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 11.01.2020

Accepted 17.02.2020

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

А *ANKRD26*-ассоциированная тромбоцитопения – это несиндромальная наследственная тромбоцитопения без патогномоничных признаков. На данный момент не существует формальных диагностических критериев данного заболевания по патогномоничным изменениям в функциональных тестах [1]. Для постановки данного диагноза необходимо проведение генетических тестов (наличие мутаций в 5'UTR области гена *ANKRD26*, выявление патогенных вариантов, проведение мультигенетической панели или использование одной из методик высокопроизводительного секвенирования) [2]. Уровень тромбоцитов при *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопении составляет обычно 50–150 тыс./мкл при отсутствии или незначительности клинически значимых проявлений кровоточивости [1, 3]. У лиц с патогенными вариантами в гене *ANKRD26* в 24 раза возрастает риск развития миелодиспластического синдрома (МДС), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и хронического миелоидного лейкоза по сравнению со здоровой популяцией [4].

Молекулярные механизмы предрасположенности к гематологическим злокачественным новообразованиям при *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопении не известны [3]. Считается, что они могут быть связаны с гиперчувствительностью клеток к тромбopoэтину, что ведет к увеличенной пролиферации клеток в связи с повышенной экспрессией *ANKRD26* [5]. Приобретенные соматические патогенетические варианты в эпигенетических регуляторах, транскрипционных факторах и регуляторах клеточного цикла были описаны в случаях миелоидной клональной эволюции [6].

В связи с нарушенным тромбоцитопоэзом у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией в мегакариоцитах и тромбоцитах ведется поиск включений патологических белков. Так, богатые убиквитином и протеасомами цитоплазматические включения (PACs), обнаруженные ранее в ряде аденокарцином [7], были найдены также в тромбоцитах и мегакариоцитах пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией, однако ни в гранулоцитах, ни в лимфоцитах эти включения не найдены [7].

Изучение активности и функций тромбоцитов пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией методом проточной цитометрии показало сниженную экспрессию гликопротеина 1 α (GPIa), а посредством трансмиссионной электронной микроскопии показано снижение число α гранул и увеличение открытой канальцевой системы, при этом функциональных изменений тромбоцитов не обнаружено [1]. По данным *P. Noris, et al.* [8], значимого дефекта в агрегации тромбоцитов в ответ на различные концентрации коллагена, АДФ или ристо-

цитина при *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопении не наблюдалось.

Для пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией не характерны иммунодефицитные состояния. При мутациях в гене *ANKRD26* гранулоциты гистологически никак не отличаются от гранулоцитов здоровых доноров. Отсутствие различий в морфологии лейкоцитов, а также данных о нарушении их функции затрудняет определение механизмов влияния мутации гена *ANKRD26* на нарушение функции этих клеток [7, 9]

В связи с возрастающим количеством данных о двунаправленном влиянии гранулоцитов и тромбоцитов в различных патологических процессах, таких как атеросклероз, тромбоз глубоких вен, сепсис и др. [10], изучение функции обоих типов клеток при нарушениях в системах гемостаза и иммунитета представляет особый интерес. На данный момент клинических тестов для изучения влияния гранулоцитов на тромбообразование и, наоборот, степени активации тромбоцитов на активность лейкоцитов не существует.

В этой статье описаны результаты наблюдения функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo* и анализа функционирования тромбоцитов *in vitro* у педиатрических пациентов с подтвержденной *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией. Показано, что при нормальном функционировании одиночных тромбоцитов у пациентов наблюдается значительное снижение площади образующихся на коллагене тромбоцитарных агрегатов. При этом гранулоциты пациентов отличаются по морфологии от гранулоцитов здоровых доноров наличием большого количества псевдоподий и повышенной склонностью к изменению формы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Использованы следующие материалы: флуорофор *Fura-Red-AM*, чувствительный к концентрации кальция, проникающий сквозь липидные мембраны клеток (*Molecular Probes*, Юджин, Орегон, США); DiOC₆, фукоидан из водорослей *Fucus Vesiculosus*, АДФ, EGTA, HEPES, бычий сывороточный альбумин, апираза (степень очистки VII), TRAP-6, антитело к CD66b конъюгированное с FITC, краситель *Alexa-647*, фибриноген человека, аннексин V (*Sigma-Aldrich*, Сент-Луис, Миссури, США), NaCl, Na₂HPO₄, KCl, NaHCO₃, MgCl₂, CaCl₂ (Агат-Мед, Москва, Россия), фибриллярный коллаген I типа (CHRONO-PAR[®], *Havertown*, Пенсильвания, США).

Метод анализа функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo*. Кровь здоровых доноров и пациентов забирали из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие гирудин (*Sarstedt Monovette*[®]). Кровь была окрашена флуоресцентными маркерами на цельные клеточные мембраны (DiOC6) и фосфатидилсерин-положительные клетки (связывание белка *Annexin V*, ассоциированного с флуорофором *Alexa-647*) в течение 3 мин при комнатной температуре. Тест проводят методом малоугловой флуоресцентной микроскопии (*Nikon Eclipse Ti-E*) при поочередном возбуждении флуоресценции образца лазерами 488 нм и 640 нм. Используется плоскопараллельная проточная камера с фиксированным размером канала: на покровное стекло наносят фибриллярный коллаген I типа. Кровь прокачивается через камеру при постоянной скорости сдвига (100 сек^{-1}) – таким образом симулируется кровоток в посткапиллярной венуле в условиях воспаления.

В поле зрения наблюдается рост тромбов с течением времени, а также крупные, движущиеся между тромбами CD66b-положительные клетки – гранулоциты – с адгезированными к ним прокоагулянтными (*Annexin V*-положительными) тромбоцитами. Проводится характеристика гранулоцитов по количеству, морфологии и скорости движения. По морфологии: проводят разделение по равномерности окраски клеток DiOC6 (показатель целостности мембран). Равномерная окраска характеризует неактивированные или слабоактивированные клетки с неокрашенными ядрами; точечная окраска – сильноактивированные клетки, для которых DiOC6 сосредоточена в мембранах митохондрий.

Метод анализа активности тромбоцитов *in vitro*. Для анализа активности тромбоцитов забор крови доноров проводили в вакуумные пробирки с гирудином не ранее чем за 3 ч до эксперимента. К цельной крови добавляли чувствительный к внутриклеточной концентрации кальция флуорофор *Fura-Red* (2 μM) и апиразу (0,1 U/мл). После инкубации в течение 30 мин при 37 °C, при которой также происходит оседание эритроцитов, богатая тромбоцитами плазма была отобрана и разведена в буфере Тирода (134 mM NaCl; 0,34 mM Na_2HPO_4 ; 2,9 mM KCl; 12 mM NaHCO_3 ; 20 mM HEPES; 5 mM глюкозы; 1 mM MgCl_2 ; 2 mM CaCl_2 , БСА 2% по массе; pH 7.3) до концентрации тромбоцитов, равной 1×10^5 тромбоцитов/мл. Анализ активации тромбоцитов проводили на проточном цитометре BD FACS *Canto II* по методике, описанной ранее [11].

В данное исследование включили двух пациентов-сиблингов, 5 и 8 лет, наблюдающихся у гематолога в консультативном отделении НМИЦ детской

гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (НМИЦ ДГОИ).

У пациентки И. (2011 г. р.) с возраста 4 лет наблюдались проявления геморрагического синдрома в виде множественных крупных экхимозов на ногах; в то же время была впервые выявлена тромбоцитопения ($58 \times 10^9/\text{л}$). Умеренная тромбоцитопения ($44\text{--}79 \times 10^9/\text{л}$), умеренный кожный геморрагический синдром (единичные посттравматические экхимозы на конечностях и петехиальные элементы на коже туловища), редкие носовые кровотечения сохранялись на протяжении года – до обращения в консультативное отделение НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (далее – НМИЦ ДГОИ). По результатам обследования в общем анализе крови имела место тромбоцитопения – до $46 \times 10^9/\text{л}$; легкая гипохромия и микроцитоз эритроцитов с нормальной концентрацией гемоглобина. Дополнительные исследования тромбоцитов показали повышенное количество микроформ; анализ функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) не выявил отличий от здоровых доноров. Результаты миелограммы из двух точек показали сниженную клеточность, полиморфность костного мозга, расширение мегакариоцитарного ростка, скудную отшнуровку тромбоцитов (в 3–5% мегакариоцитов), сохранность других ростков кроветворения. Цитогенетических нарушений в клетках костного мозга не выявлено.

У пациентки И. есть два младших брата – разнояйцевые близнецы; один из них здоров, второй – пациент М., 2014 года рождения, – имеет тромбоцитопению в анамнезе с возраста 1,5 года (от $30 \times 10^9/\text{л}$ до $52 \times 10^9/\text{л}$ к 5 годам), отмечены также проявления экхимозов, периодические носовые кровотечения, однократное субконъюнктивальное кровоизлияние. По результатам обследований в НМИЦ ДГОИ обнаружена тромбоцитопения – до $52 \times 10^9/\text{л}$; изменений морфологии или функциональной активности тромбоцитов не выявлено.

У пациентки И. и пациента М. имеетсяотягощенный семейный анамнез: отец наблюдается у гематолога с 18 лет (ранее исследований не проводили) в связи с гормонрезистентной формой хронической ИТП с тромбоцитопенией до $30 \times 10^9/\text{л}$, периодически возникающими носовыми кровотечениями, длительными кровотечениями после удаления зубов. У бабушки пациентов тромбоцитопения до $58 \times 10^9/\text{л}$ обнаружена в зрелом возрасте (ранее исследований также не проводили). Случаи ОМЛ, МДС и других злокачественных гематологических заболеваний в семье не наблюдались.

Учитывая геморрагический синдром, результаты лабораторных исследований и отягощенный

семейный анамнез, пациентке И. и пациенту М. методом высокопроизводительного секвенирования ДНК из клеток периферической крови был произведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с тромбоцитопениями, тромбоцитопатиями, коагулопатиями (таргетная панель высокопроизводительного секвенирования «Тромбоцитопении, тромбоцитопатии»). В гене *ANKRD26* в 5'-нетранслируемой области обнаружена замена одного нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.-118С > А, описанная в литературе как патогенная при *ANKRD26*-связанной тромбоцитопении. Такая же мутация была обнаружена у отца пациентов.

На основании полученных данных пациентам поставлен диагноз: «семейная (наследственная) *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения». Родителям даны общие рекомендации по профилактике и оста-

новке кровотечений, рекомендовано динамическое наблюдение у педиатра и гематолога. Оптимальный подход к наблюдению пациентов с наследственными тромбоцитопениями, ассоциированными с риском гемобластозов, не определен; на сегодняшний день принята наблюдательная тактика с контролем гемограммы без каких-либо превентивных вмешательств [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ex vivo у пациентов наблюдается сниженное тромбообразование при нормальной активности тромбоцитов *in vitro*. В первую очередь у пациентов было проведено исследование активации одиночных тромбоцитов аналогом коллагена (рисунки 1). Установлено, что внутриклеточная сигнализация (изменение концентрации кальция) и функцио-

Рисунок 1

Активность тромбоцитов в ответ на физиологическую активацию *in vitro*: средние изменения внутриклеточной концентрации кальция (А, В) и связывания фибриногена (Б, Г) при стимуляции 2 мкМ АДФ (А, Б) или 5 мкг/мл CRP (collagen-related peptide – аналог коллагена) (В, Г) тромбоцитов пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией и тромбоцитов здоровых доноров

Figure 1
Analysis of the platelet response to physiological activation *in vitro*. Mean intracellular calcium change (А, В) and fibrinogen binding (Б, Г) upon stimulation by 2 μM of ADP (А, Б) or 5 μg/ml of CRP (collagen related peptide, collagen mimetic) (В, Г) of platelets of patients with *ANKRD26*-associated thrombocytopenia or platelets of healthy donors

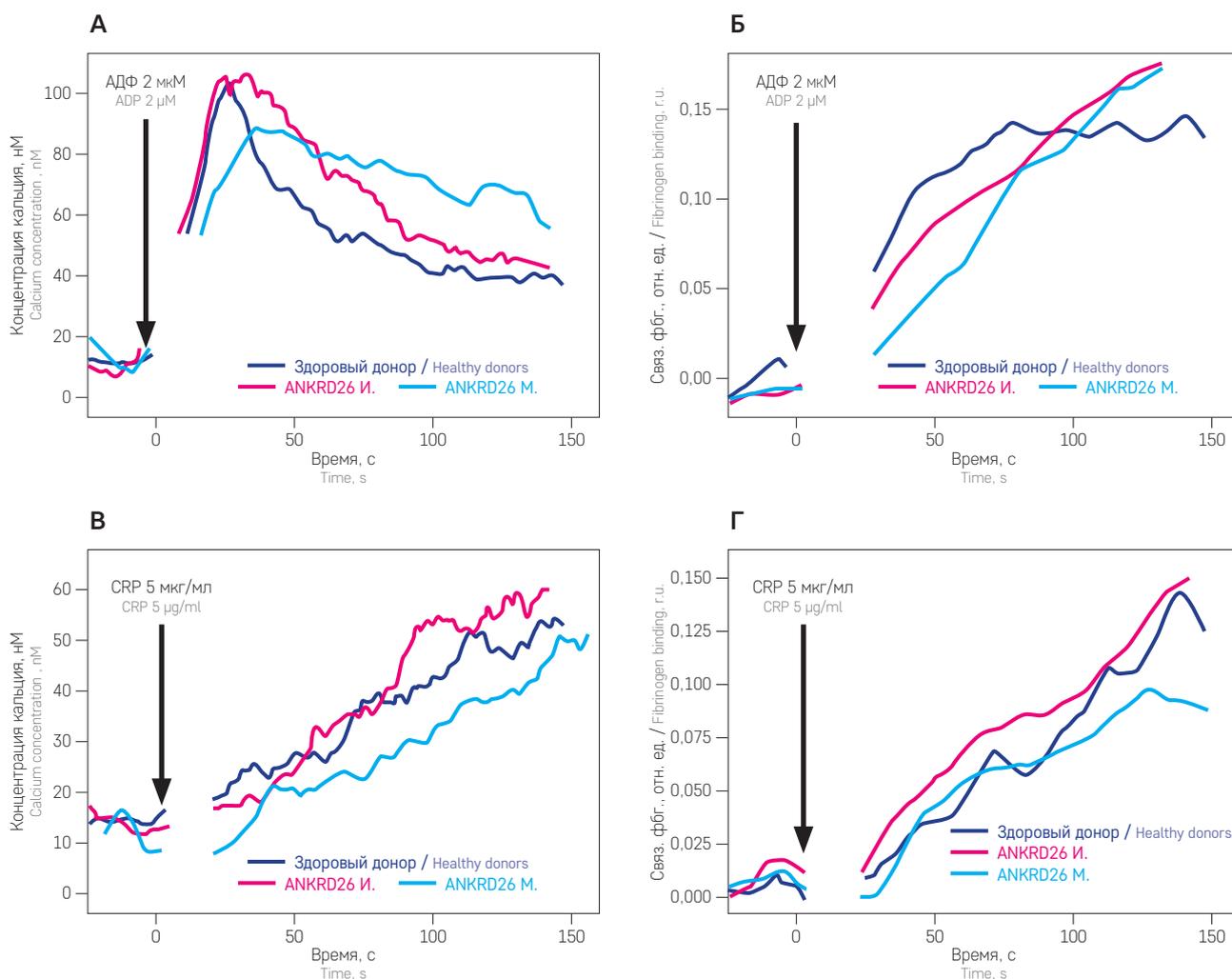
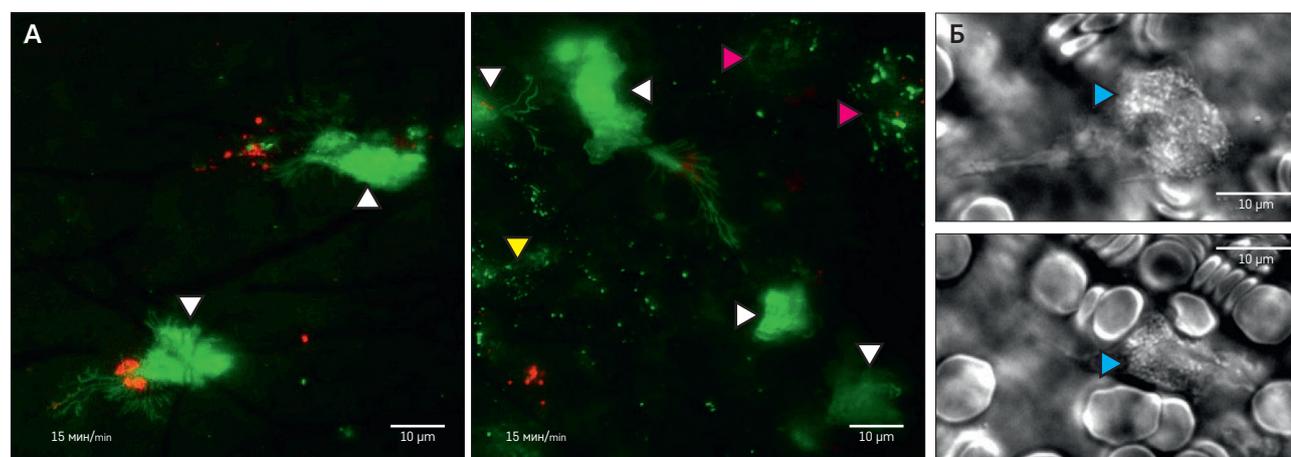
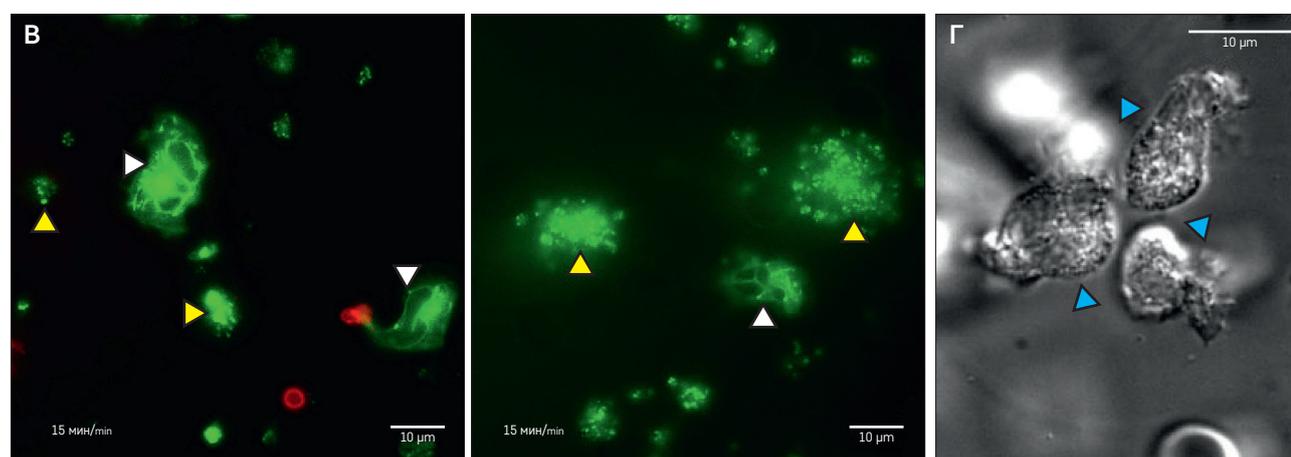


Рисунок 2

Морфология гранулоцитов и размер тромбов у пациентов (А, Б) и здоровых доноров (В, Г)

Figure 2

Granulocyte morphology and thrombus size of patients (A, B) and healthy donors (B, Г)

Типичные поля зрения для пациентов/Typical fields of view of patients**Типичные поля зрения для здоровых доноров/Typical fields of view of healthy donors**

В исследовании использовали цельную кровь двух пациентов с диагнозом «наследственная тромбоцитопения», ассоциированная с мутацией в гене *ANKRD26*, и 10 здоровых педиатрических доноров. Образец инкубировали с флуоресцентными маркерами на клеточные мембраны (DiOC6, зеленый) и фосфатидилсерин (Annexin V, красный). Образцы крови пропускали через проточную камеру над фибриллярным коллагеном I типа со скоростью сдвига 100 s^{-1} . Наблюдения проводили в малоугловом режиме флуоресцентной микроскопии (А, В) и в режиме дифференциально-интерференционного контраста (Б, Г) (*Nikon Eclipse Ti-E*). Представлены типичные поля зрения на 15-й минуте эксперимента.

Whole blood of two patients diagnosed with hereditary *ANKRD26*-linked thrombocytopenia and 10 healthy pediatric donors. Samples were incubated with fluorescent membrane marker (DiOC6, green) and phosphatidylserine sensitive marker (AnnexinV, red). Blood samples were perfused through the flow chamber over the fibrillar collagen (I type) at 100 s^{-1} shear-rate. Samples were observed at low angle fluorescent mode (A, B) or in DIC (Б, Г) (*Nikon Eclipse Ti-E*). Typical fields of view at 15 minutes from the start of the experiment are given.

нальные ответы (связывание фибриногена) при активации тромбоцитов АДФ/CRP у пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией не отличались от ответов тромбоцитов здоровых доноров.

После этого провели исследование функционирования гранулоцитов одновременно с исследованием тромбообразования на коллагене. Как и у других пациентов со сниженной концентрацией тромбоцитов, наблюдаемая площадь тромбов оказа-

лась значительно меньше, чем у здоровых доноров (рисунок 2). У здоровых доноров через 30 мин эксперимента относительное покрытие области наблюдения тромбами составляет 18–21%; у пациента И. – 8%, а у пациента М. – менее 1%.

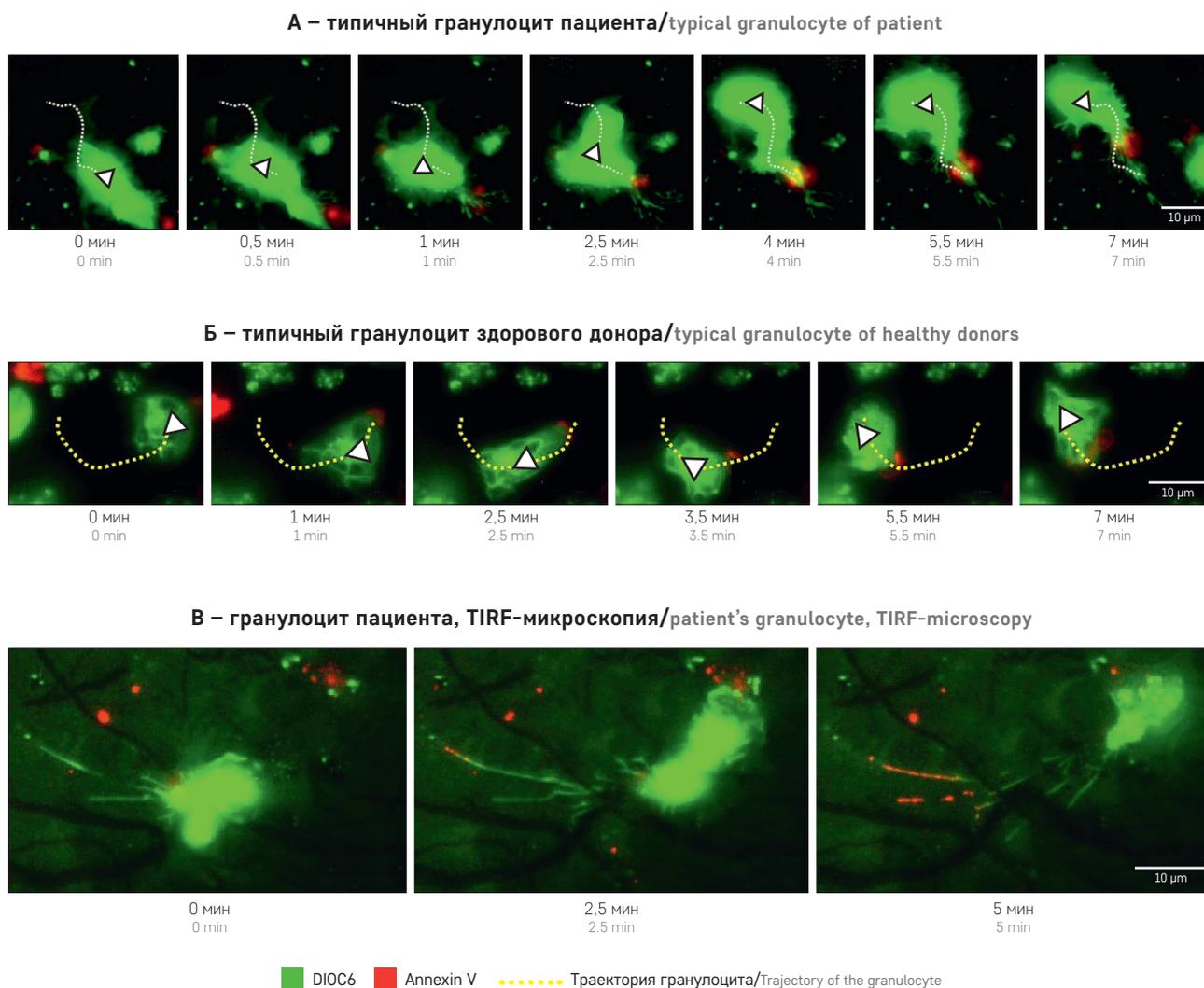
Наблюдаемая морфология гранулоцитов различна у пациентов и здоровых доноров. При исследовании образцов крови пациентов И. и М. методом анализа функционирования гранулоцитов замечены значительные отличия в морфо-

Рисунок 3

Движение гранулоцита в окрестности тромба: представлены типичные траектории и времена движения гранулоцита пациента (А) и здорового донора (Б) через 30 мин эксперимента (условия эксперимента описаны на рисунках 2 А, В); режим TIRF-микроскопии (200 нм т поверхности); наблюдается гибель псевдоподий (появление окраски Annexin V и исчезновение окраски DiOC6) при их отделении от клетки (В)

Figure 3

Granulocyte crawling among thrombi: typical trajectories of the granulocyte crawling of patient (A) and healthy donors (B) at 30 minutes from the start of the experiment (experiment conditions are given at fig. 2 A, B). TIRF-microscopy (200 nm above the surface) field of view. Death of the pseudopodia (AnnexinV binding and DiOC6 fluorescence decrease) is observed upon their detachment from the cell (B)



логии их лейкоцитов и лейкоцитов здоровых доноров (рисунки 2). На всех стадиях эксперимента гранулоциты пациентов были окрашены равномернее (без четко выделяемых структур – ядра или митохондрии) (рисунки 2 А), чем гранулоциты здоровых доноров (их типичный вид представлен на рисунке 2 В). В режиме дифференциально-интерференционного контраста подвижные гранулоциты здоровых доноров (рисунки 2 г) наблюдались как дископодобные клетки с четкими внутренними и внешними границами, а гранулоциты пациентов (рисунки 2 б) имели менее четко выраженные границы и гранулярность. Кроме того, при движении гранулоцитов пациентов наблюдалось множество (10–20) тонких псевдоподий (поперечный размер – 100–200 нм), окрашиваемых по DiOC6 (рисунки 3). Такое явление

ранее не наблюдалось в данном тесте ни у здоровых доноров, ни у пациентов с другими наследственными тромбоцитопатиями [12]. У пациентов И. и М. в ходе эксперимента отмечена также сниженная активация гранулоцитов: у здоровых доноров в первые 30 мин эксперимента 20–25% гранулоцитов находятся в распластанном состоянии, а у пациентов все наблюдаемые гранулоциты были в состоянии движения (рисунки 3).

Для гранулоцитов пациентов характерна нормальная скорость при большей кривизне траекторий движения. При автоматическом расчете скоростей движения гранулоцитов по смещению центра масс наблюдалось незначительное снижение скорости движения гранулоцитов пациентов (69 нм/с – для И. и 65 нм/с – для М.) по сравнению с грануло-

цитами здоровых доноров (68–78 нм/с). Однако при ручной обработке данных замечено, что для движения гранулоцитов пациентов характерна более изогнутая траектория (рисунки 3 а), чем у гранулоцитов здоровых доноров. Наблюдаемые при этом мгновенные скорости соответствуют таковым у здоровых доноров (0–400 нм/с). Вторая отличительная особенность движения гранулоцитов пациентов – их неустойчивость (рисунки 3 б). При смещении гранулоцита происходит отрыв и гибель некоторых из псевдоподий. Все эти наблюдения свидетельствуют об изменениях в актиновом цитоскелете гранулоцитов пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы провели *ex vivo* исследование функционирования гранулоцитов (преимущественно нейтрофилов) пациентов с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией при образовании тромбов в проточных камерах при активации фибриллярным коллагеном в цельной крови, антикоагулированной гирудином (модель повреждения посткапиллярной вены). Результаты исследования показали, что у пациентов наблюдается значительно сниженный размер тромбов по сравнению со здоровыми педиатрическими донорами. При этом у пациентов наблюдаются нормальная активность тромбоцитов в ответ на стимуляцию АДФ/коллагеном и нормальная скорость движения гранулоцитов. Наблюдается также значительное изменение формы гранулоцитов пациентов при движении по сравнению с гранулоцитами здоровых доноров.

ANKRD26 экспрессируется в клетках головного мозга, желудочно-кишечного тракта, печени, жировой ткани, гематопозитических клетках и др. Несмотря на то что точная функция этого белка в клетках неизвестна, считается, что он может принимать участие в белок-белковых взаимодействиях, в том числе с цитоскелетом [1]. Таким образом, наблюдаемые в нашем исследовании отличия формы гранулоцитов (искривленная траектория движения; см. рисунки 2, 3), а также разрыв псевдоподий, отмеченный в процессе движения (рисунки 3), могут свидетель-

ствовать о нестабильности актинового цитоскелета или актин-миозинового взаимодействия в гранулоцитах пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенетические варианты в 5'UTR гена *ANKRD26* приводят к нарушению связи транскрипционных факторов *RUNX1* и *FLI1* (фактор интеграции лейкемии Френда). В процессе нормального мегакариопоэза *RUNX1* и *FLI1* даунрегулируют экспрессию *ANKRD26*. Нарушение связывания данных факторов приводит к оверэкспрессии *ANKRD26* в мегакариоцитах и дефективной продукции тромбоцитов. Накопление *ANKRD26* в мегакариоцитах усиливает сигнализацию через *TPO/MPL* (миелолипролиферативный лейкоемический вирусный онкоген), *MAPK/ERK* и *mTOR* [13] сигнальные пути, что могло бы объяснить увеличенный риск миелоидной трансформации [14]. Наблюдаемую в данном исследовании повышенную активность гранулоцитов можно также объяснить патологическим задействованием сигнального каскада *MAPK/ERK* при активации гранулоцитов, поскольку известно, что он участвует в хемотаксисе нейтрофилов [15]. Однако для лучшего понимания молекулярных механизмов, определяющих наблюдаемые изменения морфологии гранулоцитов, требуются дальнейшие исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана стипендией Президента РФ СП-2675. 2019.4., грантом Фонда поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – детям» и грантом РФФИ 18-34-20026.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Morozova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1443-4902>
Martyanov A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0211-6325>
Panteleev M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>
Zharkov P.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4384-6754>
Fedorova D.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4567-1871>
Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Литература

1. Perez Botero J.P., Dugan S.N., Anderson M.W. *ANKRD26*-Related Thrombocytopenia, in: E. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (Ed.), *GeneReviews*, Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2018: p. 2018 Jun 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507664/>
2. Averina M., Jensvoll H., Strand H., Sovershaev M. A novel *ANKRD26* gene variant causing inherited thrombocytopenia in a family of Finnish origin: Another brick in the wall? *Thromb Res* 2017; 151: 41–3. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.01.001
3. Ердмаева Я.А., Федорова Д.В., Жарков П.А., Курникова М.А., Манн С.Г., Райкина Е.В. *ANKRD26*-связанная тромбоцитопения как частный слу-

- чай наследственной тромбоцитопении с предрасположенностью к гематологическим злокачественным новообразованиям. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 1854–61. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-54-61
4. 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. DOI: 10.1182/blood-2013-04-499319
 5. Balduini A., Raslova H., Di Buduo C.A., Donada A., Ballmaier M., Germeshausen M., Balduini C.L. Clinic, pathogenic mechanisms and drug testing of two inherited thrombocytopenias, ANKRD26-related Thrombocytopenia and MYH9-related diseases. *Eur J Med Genet* 2018; 61: 715–22. DOI: 10.1016/j.ejmg.2018.01.014
 6. Perez Botero J., Ho T.P., Hogan W.J., Kenderian S., Gangat N., Tefferi A., et al. Clinical spectrum and clonal evolution in germline syndromes with predisposition to myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2018; 182: 141–5. DOI: 10.1111/bjh.14746
 7. Necchi V., Sommi P., Vanoli A., Manca R., Ricci V., Solcia E. Proteasome particle-rich structures are widely present in human epithelial neoplasms: correlative light, confocal and electron microscopy study. *PLoS One* 2011; 6: e21317. DOI: 10.1371/journal.pone.0021317
 8. 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. DOI: 10.1182/blood-2011-02-336537
 9. Necchi V., Balduini A., Noris P., Barozzi S., Sommi P., di Buduo C., et al. Ubiquitin/proteasome-rich particulate cytoplasmic structures (PaCSs) in the platelets and megakaryocytes of ANKRD26-related thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2013; 109: 263–71. DOI: 10.1160/TH12-07-0497
 10. Rayes J., Watson S.P., Bourne J.H., Brill A. The dual role of platelet – innate immune cell interactions in thromboinflammation, 2019; 1–13. DOI: 10.1002/rth2.12266
 11. Мартыянов А.А., Морозова Д.С., Хорева А.Л., Пантелеев М.А., Щербина А.Ю., Свешникова А.Н. Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича. *Вопросы онкологии/гематологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 1.
 12. Morozova D.S., Martyanov A.A., Korobkina J.-J.D., Sokolov A.V., Shamova E.V., Gorudko I.V., Obydennyi S.I., Sveshnikova A.N. Granulocytes role in thrombus formation under low shear rate flow conditions as procoagulant platelet scavengers. In submission, 2020.
 13. Raciti G.A., Bera T.K., Gavrilova O., Pastan I. Partial inactivation of Ankrd26 causes diabetes with enhanced insulin responsiveness of adipose tissue in mice. *Diabetologia* 2011; 54: 2911–22. DOI: 10.1007/s00125-011-2263-9
 14. 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. DOI: 10.1172/JCI71861
 15. Aomatsu K., Kato T., Fujita H., Hato F., Oshitani N., Kamata N., et al. Toll-like receptor agonists stimulate human neutrophil migration via activation of mitogen-activated protein kinases. *Immunology* 2008; 123: 171–80. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02684.x

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-35-46

In silico assessment of plant L-asparaginase and estimating its allergenicity in comparison to bacteria asparaginase

Milad Yazdi¹, Maryam Kolahi², Ali Mohamad Foroghmand¹, Mohammad Reza Tabandeh³¹ Department of Genetic, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.² Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 30.10.2019

Accepted 23.12.2019

Correspondence:Maryam Kolahi, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
E-mail: m.kolahi@scu.ac.ir

L-asparaginase is widely distributed among microorganisms, animals and plants. L-asparaginase has been utilized as a drug in the treatment of lymphoid malignancies and plays a crucial role in asparagine metabolism in plant stress response mechanisms. Multiple sequence alignment of Neighbor-Joining phylogenetic tree was executed utilizing Mega 4.0. Two plants asparaginase were identified whose three dimensional structures compared well with two bacterial samples of L-asparaginase used in humans as a therapeutic drug. Prediction of antigen sites, B-cell epitope identification and prediction of epitopes by use of Cytotoxic T-lymphocyte was performed using various *in silico* server resources. The survey showed that between the 40 plants, 2 identified items of human, 12 bacteria and 6 algae of asparaginase genes, generally two main branches created that samples of green algae is in the neighborhood of to the bacterial samples. Interestingly the data showed that the two bacterial samples of L-asparaginase used in medicine, when compared to plant asparaginase genes, have less similarity to asparaginase genes of human, while the two human asparaginase genes are located perfectly between the plant groups with their sequence revealing high similarity with plant species. Although there was some allergen epitope found in plant asparaginase, these are different from the allergen epitopes of microbial asparaginase that are used as a drug in humans with no common sequence being found between them. This manuscript provides evidence suggesting the potential utilization of *Phaseolus vulgaris* asparaginase, which has less epitopes, better predicting tool scores and high similarity, in drug design as an enzymotherapy in leukemia and other cancers.

Key words: Allergenicity, L-asparaginase, *Lupinus luteus*, *Phaseolus vulgaris*

Yazdi Milad, et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 35–46.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-35-46

L-asparaginase (EC 3.5.1.1) catalyzes the hydrolysis of L-asparagine to yield L-aspartic acid and ammonia [1]. This enzyme is widely distributed among microorganisms, animal, plant, eukaryotic microorganisms such as filamentous fungi and yeasts and humans [1, 2]. L-asparaginase plays an essential role in the metabolism of asparagine in response to plant stress [3, 4]. Additionally, L-asparaginase can facilitate the translocation of nitrogen within sink organs of the plant [5]. L-asparaginase plays a vital role during development of plant nodule, seed development and germination due to its involvement in amide and amino acid metabolism [5–7]. Two asparaginase isoforms existing as K⁺-dependent and K⁺-independent plays physiological roles in many plants [8]. Recent structural and enzyme functionality data have allowed for the use of enzyme therapy as a tool in the treatment of many diseases such as cardiovascular, cancer, infection, autoimmune disorder [9].

L-asparaginase is currently used in enzyme therapy, with expanded attention in recent years due to its chief applications, which includes its use in the drug industry as a substitute for the treatment of different types of cancers such as critical lymphoblastic leukemia, malignant diseases of the lymphoid system and Hodgkin's lymphomas [1].

The use of asparaginases can result in a number of side effects. Hypersensitivity due to anti-asparaginase antibody assembly, have been detected in more than 60% of patients that use *Escherichia coli* asparaginase therapy [10]. The progress of these antibodies appears to be more commonly observed in patient that received native *Escherichia coli* asparaginase [11–13]. This enzyme is also utilized in the food industry to inhibit the formation of acrylamide when foods are processed at high temperatures. Due to acrylamide being a neurotoxin and carcinogenic, the utilization of this enzyme is imperative [14, 15].

Information about the structure and function of L-asparaginase from *Escherichia coli* and *Erwinia sp.* has led to the use of special resources for the preparation of the enzyme as a drug [14]. The use of *E. coli* L-asparaginase may be restricted due to serious adverse effects of which allergic reaction is the most common [16]. Nevertheless, the use of *Erwinia* asparaginase was extended by the Food and Drug Administration (FDA) agreement in 2011, with the aim of finding an alternative for patients with allergic reactions to *Escherichia coli*-derived asparaginase [17]. Some allergic responses involve complex interactions between the protein and the immune system, and are therefore especially difficult to predict. However, data has shown that various proteins are fundamentally more allergenic than others. Toxicologist scientists now have the challenge to overcome the issue of detecting those characteristics of proteins with the potential of encouraging allergic sensitization and allergic disease [18, 19]. In an attempt to determine the allergenic potential of peptides a comparison was made with those of known allergens and sources considered not to cause allergy in humans. Regions of homology with known protein allergens spanning eight or more consecutive amino acid residues indicates the possible existence of common epitopes, from a known allergenic source. If no noteworthy homology with known allergens is detected, this suggests that the protein probably won't be allergenic.

The asparaginase enzyme is extensively present in plants with superior properties to bacteria. The study was aimed at evaluating asparaginase from plant sources and comparing the homology of their sequence with human asparaginases and some bacteria asparaginases that are commonly used as drugs. Two known plant species were compared to two bacteria species that are used as drugs with allergenic side effects, with regards to the allergen properties of L-asparaginase peptide sequences utilizing various bioinformatics techniques.

MATERIAL AND METHODS

Phylogenetic analysis of the Asp genes and Protein Sequence Collection. For immunoinformatic and phylogenetics analysis asparaginase enzymes sequences were taken from the NCBI protein database using advanced search for the keywords, "L-asparaginase" "Asparaginase" "green plant" "Algae" and "Bacteria". Multiple sequence alignment were made using muscle algorithm of Mega 7 software and the alignment results viewed using Jalview to detect conserved residues [20]. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum likelihood method by mega7 with default setting [21].

Antigen prediction. Two methods were used for allergen prediction; the first searched for sequence similarity with alignment like SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins); the second approach was based on detection of motifs that proved to be allergen like VaxiJen. Both of them depended on the sequence but the second was alignment-free. The first server that was used was Vaxijen. Vaxijen uses three databases for prediction: bacteria, virus and tumor. Antigen prediction for the tumor database, the used threshold was as default of database [22]. The AlgPred server was used for prediction of allergens based on IgE epitopes [23]. The SDAP database was another database used for prediction based on alignment of AllergenFP v1.0 [24, 25]. The amino acids in the protein sequence in data sets were described by five E-descriptors and the strings were transformed into uniform vectors by auto-cross covariance (ACC) transformation. The first principal component (E1) reflects the hydrophobicity of amino acids; the second (E2) – their size; the third (E3) – their helix-forming propensity; the fourth (E4) correlates with the relative abundance of amino acids; and the fifth (E5) is dominated by the β -strand forming propensity. The last server that was utilized was AllerTOP v.2 that is another free alignment tool [26].

Prediction of Immunogenic Epitopes

B-CELL epitope(s). To predict B-cell epitope(s) three linear software were utilized.

ABCpred. ABCpred server was the first one that was able to predict epitopes with 65.93% accuracy using recurrent neural network [27]. 16 was selected as the window length for prediction and 0.51 as the threshold.

BcePred Prediction Server. BcePred was the second tool used for predicting linear B-cell epitopes in a protein sequence [23]. This server allows users to predict B-cell epitopes using any of the physico-chemical properties (hydrophilicity, flexibility/mobility, accessibility, polarity, exposed surface and turns) or a combination of properties. The server was able to predict epitopes with 58.7% accuracy.

ElliPro Predicted Server. ElliPro predicts linear and discontinuous antibody epitopes based on a protein antigen's 3D structure. ElliPro accepts as an input, protein structure in PDB format. ElliPro associates each predicted epitope with a score, defined as a PI (Protrusion Index) value averaged over epitope residues. In this method, the protein's 3D shape is approximated by a number of ellipsoids, so that the ellipsoid with PI = 0.9 would include within 90% of the protein residues with 10% of the protein residues being outside of the ellipsoid. The default minimum score is 0.5 but for stronger

result 0.7 was chosen and a maximum distance of 6 (angstrom) [28].

T CELL epitope(s). NetCTL was used to predict T cell epitopes based of protein sequence. A threshold of 0.75 was chosen that is equal to 0.8 sensitivity and 0.970 specificity. The weight on C terminal cleavage and the weight on TAP transport efficiency were 0.15 and 0.05, respectively [28].

RESULTS

Protein Sequence Collection, Phylogenetic analysis of the Asp genes, Classification for L-asparaginase Genes. Initially 60 L-asparaginase sequences from plants (40 sequences), algae (6 sequences), bacteria (12 sequences) species, and two human L-asparaginase genome were sequenced. The outcome of the extensive database search is briefed in *Table 1*. The study aimed to compare 60 L-asparaginase genes of human, bacterial, algae and plants in an attempt to identify more appropriate sources of medicinal asparaginase based on the extent of the similarities and differences of the sequences. Phylogenetic analyses permitted the recognition of evolutionary conservation and gene divergence. A maximum likelihood tree was produced from amino acid sequences of the deduced full-length peptides with the best-fit evolutionary Mega 7 (*Figure 1*). The survey showed that between the 40 plants, 2 identified items of human, 12 bacteria and 6 algae of asparaginase genes, generally two main branches created that samples of green algae is in the neighborhood of to the bacterial samples.

These homologs and a few evolved in plant and human asparaginase genes indicated a common eukaryotic ancestor. Points to note in relation to the clade of plant asparaginase genes is that in some cases the species belonging to monocotyledons and dicotyledons would have been well separated, even with those species belonging to a family of plants put together, that indicates conserved regions between these parts of the gene. For example, species belongs to the family Fabaceae (marked with the blue square), Gramineae (marked with the brown diamond) and Ephorbiaceae (marked with the green triangle) would have been isolated. On the other hand some species belonging to one plant family are quite far from this tree (marked with the yellow triangle).

Allergenic Site Prediction. In order to study and predict the sites of the antigens in the asparaginase plant, 60 samples were studied using Phylogenetic analysis; two samples of *Lupinus luteus* and *Phaseolus vulgaris* which are known 3D plant asparaginase were compared in terms of the antigen peptides with two samples of bacteria asparaginase (*Erwinia chry-*

santhemii and *Escherichia coli*) which are used as drugs were selected.

Vaxijen server. Vaxijen server was the main server utilized for alignment-independent prediction of protective antigens. Outcome displays that both bacterial samples are antigen and both plants are non-antigen but are close to the threshold (0.5) (*Table 2*).

AlgPred server. The AlgPred server predicts allergens based on several algorithms that include, Mapping of IgE epitopes and PID, MEME/MAST motif, SVM module based on amino acid composition, SVM module based on dipeptide composition, Blast search on allergen representative peptides (ARPs). Only *Phaseolus vulgaris* showed a non-allergen base all algorithms. Also both plant asparaginases were found as non-allergen SVM module based on dipeptide composition with appropriate and acceptable scores while both bacterial asparaginases were seen as allergens in this algorithm (*Table 3*).

Search of samples performed in the SDAP allergens database. Results show that the FASTA alignments between the plant and bacteria asparaginases and all SDAP allergens have an E score higher than 0.010000 that is, none of them are allergens. The outcome of AllergenFP v1.0 was that with the exception of *Lupinus luteus* other asparaginases are probable allergens. The results from AllerTOP v. 2.0 are that bacterial samples are probable allergens and plants are non-allergen. These two last servers supported the results of AlgPred and VaxiJen servers about being none allergen plant asparaginases.

Prediction of Immunogenic Epitopes

Linar-B-cell Epitopes. ABCpred: In this array the predicted B cell epitopes are ranked according to their score obtained by trained recurrent neural network. Higher scores of the peptide mean higher probability of being an epitope. All the peptides shown here are above the threshold value of 0.8 while the default of ABCpred is 0.5. In plant asparaginases, sixteen peptide sequence were selected for any plant with a score between 0.8–0.96, as the most probable sequence that six of them was almost same. The common sequences in both plants to arrange the score amount included: “EASIMDGNTMKCGAVS”, “SGRIGDSPLIGAGTYA”, “MGGWAIHAVHGGAGVDP”, “TPLIGAGTYANELCAV”, “VRELETDFLNSGRGS” and “TGGLMNKMSGRIGDSP” (*supplemental Table 1*) highlighted with the same color. The start position of these common sequences in two plant species is close to each other. Needless to say, these two species in terms of phylogenic and aliment results for asparaginases do not have high affinity together (*Figure 1*).

The servers showed fifteen peptide sequences for *Erwinia chrysanthemi* and fourteen peptide sequences

Table 1

Genomic characteristic, number of L-asparaginase sequences and levels of alternative transcripts in plants, human, algae and bacteria were studied

Organism	GenBank ID	Type	Length (as)
Homo sapiens	AAM28434.1	asparaginase like protein	308
Homo sapiens	AAA35903.1	glycosylasparaginase	346
Shewanella baltica	KZK65943.1	L-asparaginase 1	337
Dickeya dadantii	OOC15512.1	L-asparaginase	348
Oribacterium	SEA64443.1	L-asparaginase	339
Enterococcus faecalis	OYN35025.1	L-asparaginase	321
Burkholderia	AMM17015.1	L-asparaginase	369
Escherichia coli	AAA23445.1	L-asparaginase II (ansB)	348
Erwinia teleogrylli	WP_058909779.1	L-asparaginase 1	338
Bacillus sonorensis	EME73692.1	L-asparaginase	329
Algoriphagus machipongonensis	EAZ80348.1	L-asparaginase	355
Bacillus thuringiensis	YP_035712.1	L-asparaginase	324
Alcaligenes faecalis	OSZ31330.1	L-asparaginase	329
Zostera marina	KMZ61400.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	309
Carica papaya	XP_021909378.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	305
Prunus persica	XP_007209366.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	320
Phalaenopsis equestris	XP_020599431.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	320
Phaseolus vulgaris	ABC01060.1	L-asparaginase 2	326
Cajanus cajan	KYP47966.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	321
Ananas comosus	OAY72256.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	322
Populus tomentosa	APR64035.1	L-asparaginase family protein	328
Brassica napus	XP_013715619.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	315
Hevea brasiliensis	XP_021674871.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	322
Pinus sylvestris	CAK22360.1	L-asparaginase	375
Sesamum indicum	XP_011086915.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	321
Sorghum bicolor	XP_002464265.2	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	423
Glycine max	AAM23265.1	L-asparaginase	326
Glycine max	NP_001236606.2	L-asparaginase	326
Glycine max	AFA35112.1	asparaginase 2	327
Medicago truncatula	AES59377.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	325
Arabidopsis lyrata	EFH49598.1	L-asparaginase	315
Arachis duranensis	XP_015943800.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	323
Auxenochlorella protothecoides	KFM25994.1	L-asparaginase 1	338
Dendrobium catenatum	XP_020704297.1	isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	326
Hordeum vulgare	AAG28786.1	asparaginase	333
Dorcoceras hygrometricum	KZV21706.1	L-asparaginase	321
Asparagus officinalis	XP_020270247.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	326
Glycine soja	KHN15197.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	322
Helianthus annuus	XP_022039003.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	313
Cucumis sativus	KGN55235.1	L-asparaginase	294
Momordica charantia	XP_022156717.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	319
Lupinus angustifolius	P30364.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	325
Ostreococcus tauri	OUS46332.1	L-asparaginase 1	404
Lupinus angustifolius developing seed	CAA43099.1	developing seed L-asparaginase	325
Helicosporidium	KDD76357.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	401
Herrania umbratica	XP_021286498.1	Isoaspartyl	320
Populus trichocarpa	EEE81702.1	L-asparaginase family protein	328
Jatropha curcas	XP_012080428.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	321
Klebsormidium nitens	GAQ80197.1	asparaginase	451
Micromonas commoda	ACQ68792.1	asparaginase	479
Micromonas pusilla	XP_003055370.1	asparaginase	431
Morus notabilis	EXB89117.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	316
Spinacia oleracea	XP_021855270.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	318
Prunus avium	XP_021809982.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	320
Arabidopsis thaliana	BAB02681.1	L-asparaginase (L-asparaginea midohydrolase)	325
Manihot esculenta	XP_021614687.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	323
Triticum urartu	EMS61236.1	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase	343
Lupinus albus	AAA33409.1	L-asparaginase	325
Lupinus luteus	AAD03742.1	L-asparaginase	325

Figure 1

Phylogenetic tree of the Asp ortholog genes in human, bacteria, algae and plants. The tree was generated using the neighbor joining method and Mega 7 software based on homology between amino acid sequences of the Asp plants (40 sequences), algae (6 sequences) and bacteria (12 sequences) species. The bootstrap values are at the nodes

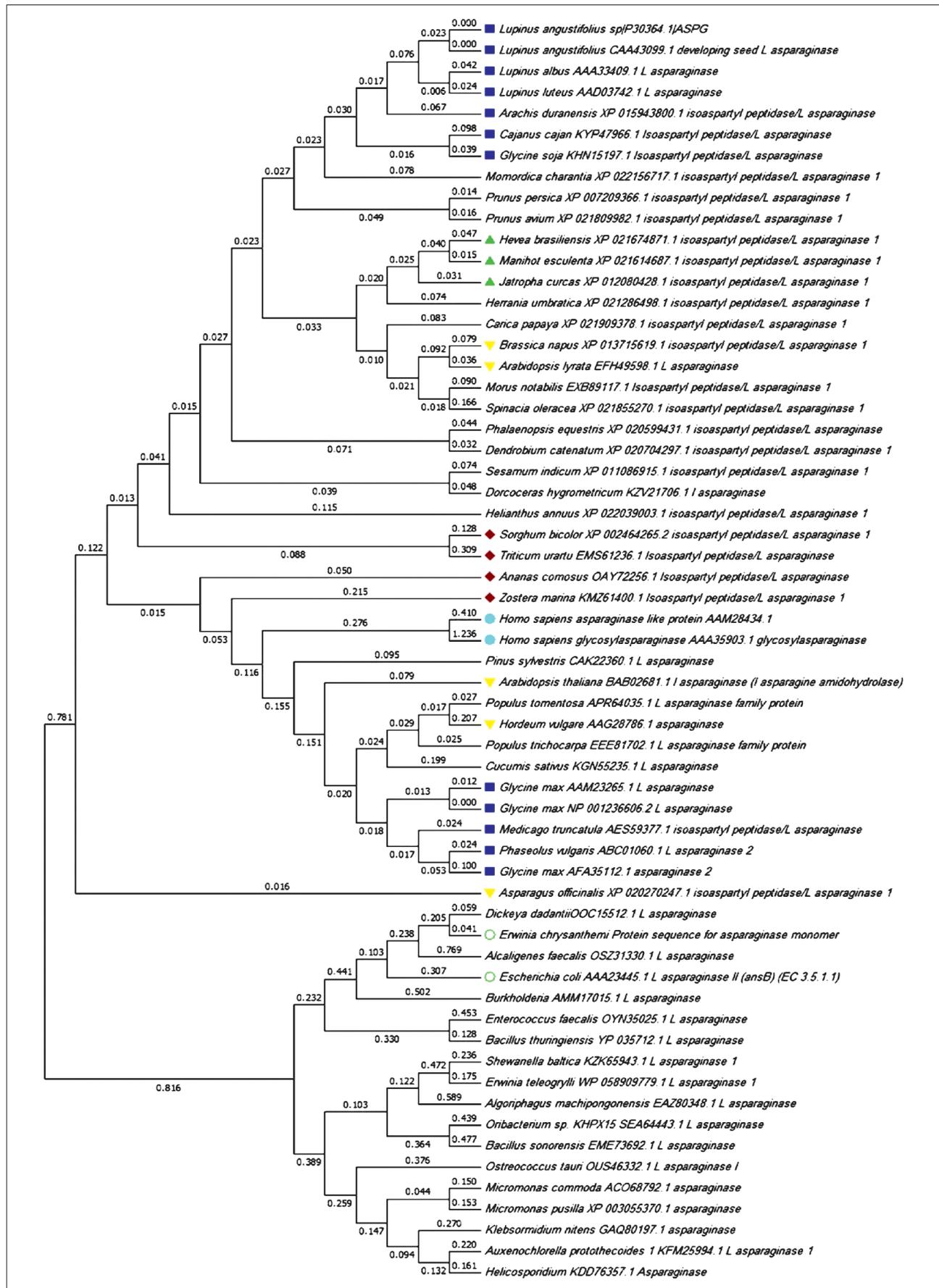


Table 2

VaxiJen models validation in two plants and two bacteria species

Organism	Overall Antigen Prediction	Type
<i>Escherichia coli</i>	0.5629	Antigen
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.5574	Antigen
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0.4961	Non-antigen
<i>Lupinus luteus</i>	0.4847	Non-antigen

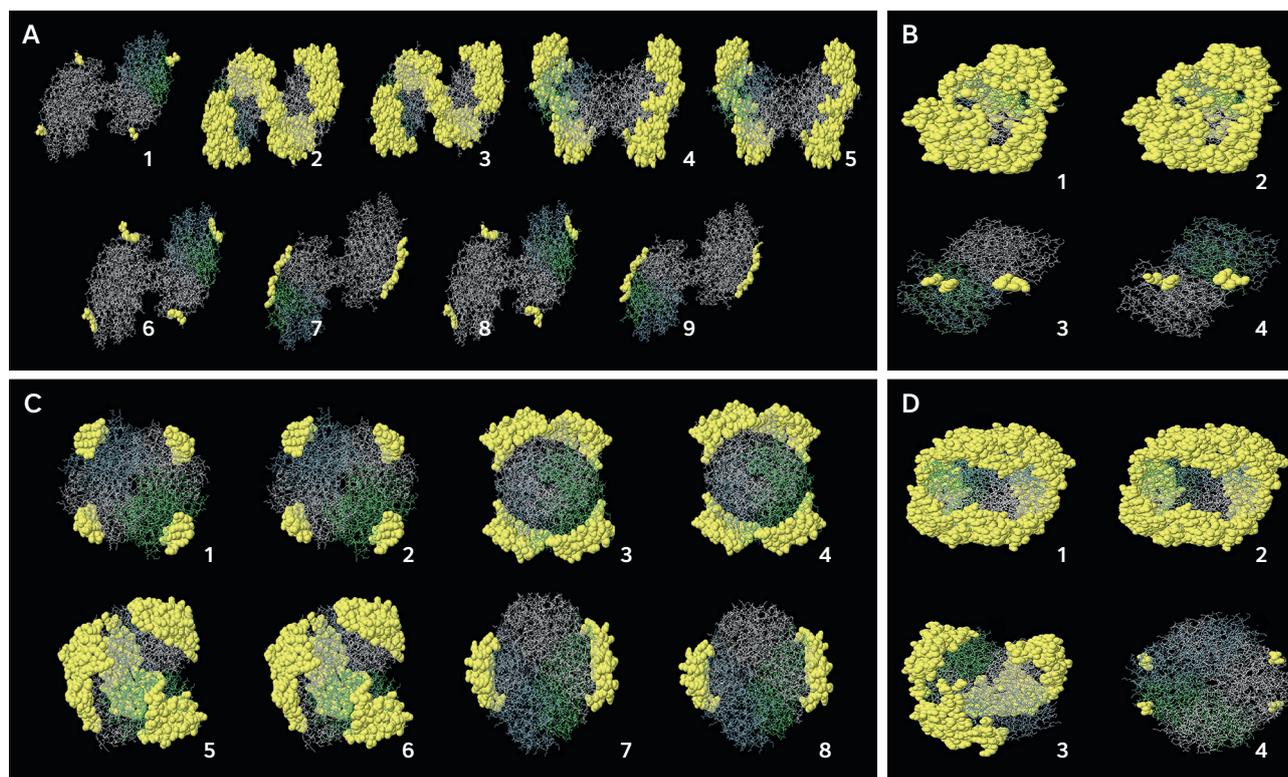
Table 3

The possibility of allergens or non-allergens asparaginases in two plants and two bacteria species shown in terms of Mapping of IgE epitopes, PID, MEME/MAST motif and SVM module using AlgPred server

Organism	Mapping of IgE epitopes and PID	MEME/MAST motif	SVM module based on amino acid composition	Score Threshold= -0.4	SVM module based on dipeptide composition	Score Threshold= -0.2	Blast search on allergen representative peptides (ARPs)
<i>Escherichia coli</i>	Non-Allergen	Non- Allergen	Allergen	1.5802423	Allergen	1.3716288	Non-Allergen
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Non-Allergen	Non- Allergen	Allergen	-0.31327275	Allergen	0.13209808	Non-Allergen
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Non-Allergen	Non- Allergen	Non- Allergen	-0.53965517	Non- Allergen	-0.49685789	Non-Allergen
<i>Lupinus luteus</i>	Non-Allergen	Non- Allergen	Allergen	-0.1842798	Non- Allergen	-0.37416826	Non-Allergen

Figure 2

3D Representation of the predicted discontinuous epitopes asparaginases protein of *Lupinus luteus* (A), *Phaseolus vulgaris* (B), *Erwinia chrysanthemi* (C) and *Escherichia coli* (D) as predicted by ElliPro



for *Escherichia coli* selected with a score of between 0.8–0.94 as the most probable sequences that four of them were almost the same but with different scores in each species such as: “TVKSDKPVVFAAMRP”, “PKVGIVYNYANASDLP”, “PSTSMSADGPFNLYNA”, “DGVVITHGTDVVEESA” and “TSLPKVDILYGYQDDP” (supplemental Table 1). These sequences had no similarity with the plant asparaginases. Based on the asparaginase bacteria being allergenic, the result of this can be compared, and we can postulate that the epitopes of bacterial allergens cannot be found in asparaginases plants whereas linear-B-cell epitopes, can be found in nearly every organism investigated, for the other enzyme, including animals such as mammals and insects as well as in fungi, plants, and bacteria.

BcePred Prediction Server. In this array, asparaginases peptide sequences are evaluated for the prediction of continuous B-Cell epitopes in antigenic sequences utilizing seven physico-chemical properties such as hydrophilicity, flexibility, accessibility, turns, exposed surface, polarity and antigenic propensity with 58.7% accuracy. Epitopes identified for every seven physico-chemical property for plant and bacteria asparaginases showed that these were comparable in terms of number, length and amino acid sequence.

Predicted Linear Epitope(s) with Ellipro. In the study of asparaginases with Ellipro epitope predictor program, 9 peptides with scores of 0.0744–0.788 and 6 peptides with scores of 0.0706–0.878 were detected in *Lupinus luteus* and *Phaseolus vulgaris* respectively whereas in *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*, 7 and 5 peptides were distinguished with scores of 0.0702–0.868 and 0.08–0.912 respectively. Association of the obtained score for animal and plant species with regards to the 0.7 threshold of the server shows that the plant species in comparison to bacterial samples have less allergenicity, which is possibly due to the Ellipro server with *Phaseolus vulgaris* being better than any of the other plant species. Details shown in Table 3 supplemental, indicate that the starting point of the detected epitope sequence in plants and bacterial asparaginases are the same or are placed close to each other. The scores that are defined by the server for plant asparaginases shows that the rate of their allergies are close to the server threshold or slightly higher than it and that this rate in comparison to the score for bacterial epitopes did not show specified differences even though the distinguished epitopes is different between bacterial and plant species. Figure 2 shows the results of the predicted discontinuous epitope(s) Ellipro, amino acid residues, the number of residues, sequence location as well as their scores which are tabulated in Table 3 supplemental.

The graphical representation of the discontinuous epitopes is displayed in Figure 2. 3D Representation of the predicted discontinuous epitopes asparaginases protein predicted by ElliPro are presented based on the scores which are listed in Table 3. As seen in Figure 2, there are nine 3D structures for *Lupinus luteus*, four 3D structures for *Phaseolus vulgaris*, eight 3D structures for *Erwinia chrysanthemi* and four 3D structures for *Escherichia coli*. Their characteristics are presented in Table 4 supplemental.

Predicted with NetCTL-1.2. In the array of asparaginases with the NetCTL-1.2 program, 8 peptides with scores of 1.0281–3.1539 and 7 peptides with a score 0.7762–0.8558 were identified in *Lupinus luteus* and *Phaseolus vulgaris* respectively, whereas in *E. coli* and *Erwinia* 9 peptides were distinguished with scores of 1.1059–1.3235 and 0.9369–2.5751 respectively. The common sequences in both plants resulting in these scores includes: “VMDKSPHSY, EANTILFDY and ATEDGFMVV” as revealed in the Table 4 supplemental, highlighted with the same color. The start position of these common sequences in the two plant species is close to each other. The common sequence in the studied bacteria was presented with different scores in each species followed: “SADGPFNLY” and “ELPKVGIVY” (supplemental Table 4). These sequences did not show any similarity between asparaginases of plants and bacteria. Based on the obtained results and scores for the detected peptides and the threshold number of 0.75 in NetCTL-1.2 programs it appears that *Phaseolus vulgaris* was the lowest-rated allergenic compared to bacterial and any other plant species.

DISCUSSION

The survey showed that between the 40 plants, 2 identified items of human, 12 bacteria and 6 algae of asparaginase genes, generally two main branches created that samples of green algae is in the neighborhood of to the bacterial samples. Interestingly the data showed that the two bacterial samples of L-asparaginase (*Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli*) (marked with the green hollow circle) used in humans as a therapeutic drug often resulting in allergies [29], in comparison to plant asparaginase genes, have less similarity to human asparaginase genes, while the two human asparaginase genes (marked with the green bold circle) are located perfectly between the plants group and their sequence reveals significant similarity with plant species (Figure 1). This leads to the point that various isoforms of asparaginase genes are present in plants. Database research confirmed the existence of isoforms of asparaginase genes in plants. Crystallography of this enzyme also supports two

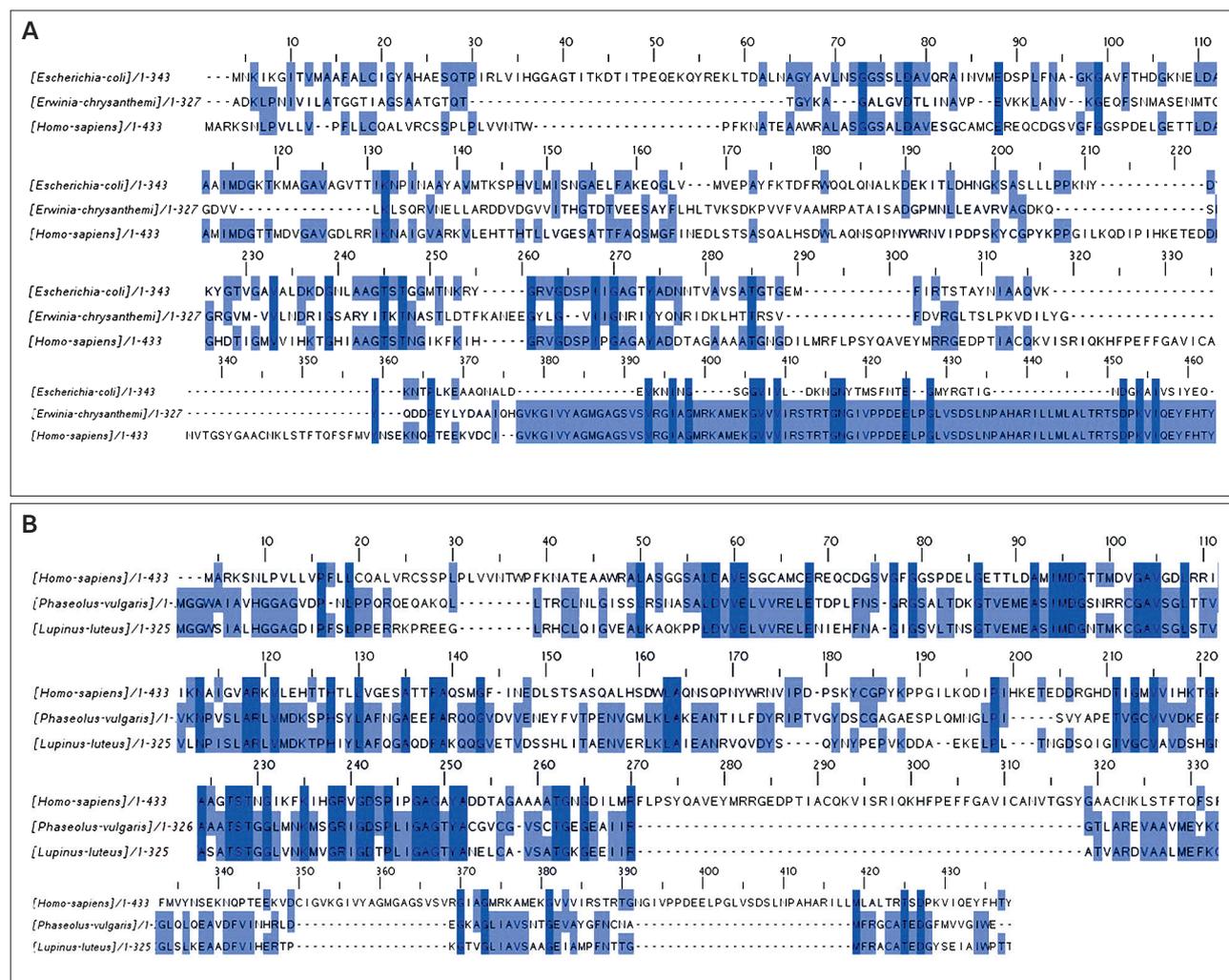
types of isoforms of L-asparaginase enzymes which included potassium-independent plant asparaginase (in *Lupinus luteus*) and potassium-dependent plant-type L-asparaginase (in *Phaseolus vulgaris*) [30, 31]. A comparison of the three PvAspG1 structures setting the catalytic switch to ON (when K^+ is coordinated) or OFF (when Na^+ is coordinated) respectively allows or prevents anchoring of the reaction substrate/product in the active site [31]. Based on biochemical and molecular data, L-asparaginase has a variety of functions in plants, including catalytic activity, asparaginase activity, hydrolase activity (acting on carbon-nitrogen but not peptide bonds), in linear, amides, cellular component, intracellular, cell and cytoplasm [32]. Plant type L-asparaginases differ structurally and have a different evolutionary origin than bacterial L-asparaginases [30]. Alignment was performed between two plant L-asparaginases (*Lupinus luteus* and *Phaseolus vulgaris*), human L-asparaginase and L-asparaginases (*Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli*) (Figure 3).

Sequence alignment Protein BLAST results on NCBI between human asparaginase and two plant L-asparaginases (*Lupinus luteus* and *Phaseolus vulgaris*) and bacteria asparaginase (*Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli*) showed *Phaseolus vulgaris* with identity 30%, Query cover 82% and E value $2e-25$ having the highest similarity, *Lupinus luteus* with 30%, Query cover 76% and E value $4e-24$ having the second similarity and *Erwinia chrysanthemi* with 33%, Query cover 6% and E value 4.3 having less similarity while *Escherichia coli* due to lack of similarity was removed from this alignment description.

Based on the x-ray structure, a three-dimensional model of the spatial conformation and catalytic site of the enzyme, Sanguinarine reductase in plant, has high structural similarity with enzymes of human and bacteria with similar functions as the plant homologs but bear little amino acid sequence similarity, in fact they have similar enzyme activities, i.e. mostly NAD-dependent sugar phosphate epimerases/dehy-

Figure 3

Multiple alignments of the amino acid sequences of Asps orthologous from (A) human and plants, (B) human and bacteria, using muscle alignment tool, as seen with Jalview tool. Residues shaded in blue are identical amino acids with other Asps protein sequences, focusing on the conserve motif regions (Accession numbers for the sequences shown are in Table 1)



dratases or hydroxysteroid dehydrogenases/isomerases [33].

Rosati et al. focused on the enzyme 5 α R, pointing out new similarities between human and plant steroid metabolism. They showed the ability of the human isozymes of 5 α R, to reduce campestenone, the natural substrate of the known plant enzyme DET2, the first direct evidence for human 5 α R. Results of this research revealed that type 5 α R human isozyme with higher affinity reduced DET2 as the plant substrate [34].

Although there was some allergen epitope found in plant asparaginase, these are different from the allergen epitopes of microbial asparaginase that are used as a drug in humans with no common sequence being found between them. VaxiJen server is a consistent and regular tool used for the forecasting of protective antigens. It can be used separately or in combination with other bioinformatics tools used for antigen site [22].

Study on plant allergens showed that dissimilar products can include similar allergenic proteins. Some allergen proteins that bound to IgE in allergic patients were identified including Jun a 3 (pollen of mountain cedar), Cap a 1 (bell pepper), Pru av 2 (cherry), Act c 2 (kiwi), Lyc e NP24 (tomato), and Mal d 2 (apple) that belonged to pathogenesis related proteins of group 5 (PR5) [35, 36]. SDAP covers data for above 800 allergens and wide bibliographic references in a relational database with contacts to other publicly available databases. SDAP is available without restrictions on the Web, allowing researchers to easily find structural and functional relations among known allergens and to recognize theoretically cross-reacting antigens [36]. Verma et al. processed the allergenicity prediction of transgenic proteins expressed in genetically modified crops using AlgPred server in order to tract the probability, reducing incorrect predictions to a great extent (74–78%) [37]. AlgPred server has been used for the calculation of new allergens in genetically modified (GM) foods and biopharmaceuticals [38].

Additionally, some enzymes have been identified as an allergen in fish, midges, crustaceans, and various plants based on *in silico* Prediction of T and B Cell Epitopes [39–42]. Research has been performed on predicting protective continuous B-cell epitopes on plant pathogen proteins using the ABCpred server [43].

The results (*supplemental Tables 2*) showed that some peptide sequences were classified on the basis of their physicochemical characteristics are the same in the two plant species and these sequences are different from the common sequences in bacteria asparaginases (*supplemental Tables 2*). For example “TNSGTVE”, “ATSTGG” are common sequences in plant asparaginases and “RACATEDG” instead of “HGTDT” and “TKTN” are common sequences in bacteria

asparaginases based on hydrophilicity features whereas “RELE”, “DKTPHIY” and “AQDFAKQQGVE” are common sequences in plants asparaginases instead of “ANVKGEQ”, “TVKSDKPVV” and “TKTN” which are common sequences in bacteria asparaginases based on accessibility features. The arrangement of antigenic elements in the epitopes and non-epitopes disregarding the antigen reconfiguration in Ag-Ab complex may not precisely reflect biological actuality [44]. The accurate identification of B-cell epitopes establishes a source for improvement of antibody therapeutics [45], and immunodiagnostic tools [46]. Scientists believe B-cell epitopes are arranged based on the three-dimensional structure as continuous (linear or sequential) and discontinuous (nonlinear or conformational) epitopes; in the latter case amino acid residues are in close contact due to the three-dimensional conformation. Amino acid sequence ranging from at least 20 to 400 amino acids is necessary for appropriate folding of the discontinuous epitope in native proteins. Many scientists assume that most of the identified linear antigenic determinants are a part of the conformational B-cell epitopes [47–49]. Descriptions are less stringent for stability, and confirmed that the majority of discontinuous epitopes (over 70%) have 1–5 linear segments with 1–6 amino acids [50]. Presently, epitopes play important roles in the course of cell development such as the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and the extracellular domain of insulin-like growth factor-1 receptor which have been predicted by BcePred Prediction Server *in silico* methods [51, 52].

ElliPro together with other algorithms and web programs are able to predict the antibody epitopes in a protein sequence or structure. ElliPro presents the best epitope prediction in comparison to common methods based on structure. Another advantage of ElliPro is its ability to predict based on the geometrical properties of protein structure. Without involved preparation one can predict different kinds of protein-protein interactions [28]. Dall'Antonia et al., identified IgE-binding epitopes of two allergens by utilizing several servers, which expressed the highest specificity found by ElliPro for both studied allergens in comparison to other tools [53]. Jimenez-Lopez et al., were able to study Epitopes of β -conglutinin proteins in *Lupinus angustifolius* with emphasis on cross-allergenic reactivity in comparison to some legumes [54]. Kundu et al. determined that two of these 10 fragments, exist in major immunogenic epitopes which are restricted on the outer surface of the protein MTC28 molecule of *Mycobacterium tuberculosis* which have key roles in the mycobacterial infection pathway. They were also able to predict the continuous epitope *in silico* with ElliPro [55].

The NetCTL 1.2 server can therefore be used for the prediction of epitopes by using cytotoxic T lymphocyte (CTL) that induced immunological tolerance in autoimmunity and allograft transplantation [56]. Larsen et al. (2007) showed that NetCTL-1.2 has an advanced predictive performance than other servers such as EpiJen, MAPPP, MHC-pathway, and WAPP [57]. CTL epitope prediction was an essential *in silico* tool in the allergenic research as it reduces the requirement for *in vitro* tests [56]. NetCTL-1.2 has been used as an integrative method for prediction of 9-mer CTL epitopes [58].

CONCLUSION

The data interestingly showed that the two bacterial samples of L-asparaginase used in humans as therapeutic drugs that often cause allergies compares well with the plant asparaginase genes and have less similarity to the human asparaginase. The two human asparaginase genes are located perfectly between the plant groups in the phylogenetic tree. Sequence alignment results from the Protein BLAST on NCBI between human, two plants and two bacteria asparaginase showed that *Phaseolus vulgaris* has the highest similarity with human, while *Escherichia coli* due to lack similarity was removed from the alignment description. Results of Allergenic Sites Prediction showed that both asparaginase bacterial samples are antigen and both asparaginase plants are non-antigen in Vaxijen and AlgPred server, in the majority of tests. Some common sequences were detected as epitope by all of the three servers *ABCpred*, *BcePred* and *ElliPro* linear that was based on B-cells epitopes designed in asparaginases which is as follows: "IPFSLPPERKPREEGLRHCL", "ALKAQKPPLDV", "NIEHFN", "SHLITAENVERLKLA" and "RACATE" epitopes in *Lupinus luteus*; "VDPTLPLERQEE" epitope in *Phaseolus vulgaris*; "VKCDKP" and "TSDTPFDVSKLNELPK" "VFDVRGLTSLPK" epitope in *Escherichia coli* and at least "LGVDTLINAVPEVKLANV", "DAAIQH", "GVK" epitopes in *Erwinia chrysanthemi*. Predictions based on T-cells in NetCTL-1.2 server also showed

that the *Phaseolus vulgaris* has the lowest-rated allergies compared to bacterial and the other plant species. The data shows consistent scoring of various structures indicating a better presentation than any single term. On a whole it appears that the difference in allergenic scores between plants and microbial asparaginases rating based on the used software is remarkable. Although some allergen epitope are found in plant asparaginase, these are absolutely different from the allergen epitopes in microbial asparaginase that is used as a drug and results in allergies in humans. No common sequence could be found between them. The study of plant asparaginases indicates that the type of allergenic is completely different in plant asparaginase, it can be used as drug independent or use after emergence allergy of *Erwinia* asparaginase in patient. This manuscript affords an outline of available evidence proposing that *Phaseolus vulgaris* asparaginase has less epitopes and better scores in predicting tools and high similarity with the potential to be considered for drug design as enzymethrophy in leukemia and other cancers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the support of Mohadeseh Dadmehr for making the graphic abstract.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ORCID

Yazdi M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3374-667X>

FUNDING

This work was funded by a grant from the Shahid Chamran University of Ahvaz Research Council (Grant NO: 94/3/02/31580).

AUTHORSHIP

Kolahi carried genetic feature analysis and drafted the manuscript. Yazdi studied bioinformatics aspects. Foroghmand performed some analysis and visualization of results. Tabandeh provided suggestions for editing and revising the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

The online version of this article contains a date supplement.

References

- Cachumba J.J.M., Antunes F.A.F., Peres G.F.D., Brumano L.P., Santos J.C.D., Da Silva S.S. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. *Braz J Microbio* 2016; 47: 77–85.
- Ruma K., George T.K., Aswani P., Jisha M.S. Production and Optimization of Extra Cellular L-asparaginase by *Fusarium solani* Isolated from *Withania somnifera*. *J Bio Active Pro Nat* 2017; 7: 81–8.
- Cho C., Lee H., Chung E., Kim K.M., Heo J.E., Kim J., et al. Molecular characterization of the soybean L-asparaginase gene induced by low temperature stress. *Mol Cells* 2007; 23: 280–6.
- Lea P.J., Sodek L., Parry M.A.J., Shewry P.R., Halford N.G. Asparagine in plants. *Ann Appl Biol* 2007; 150: 1–26.
- Canas R.A., Quillere I., Lea P.J., Hirel B. Analysis of amino acid metabolism in the ear of maize mutants deficient in two cytosolic glutamine synthetase isoenzymes highlights the importance of asparagine for nitrogen translocation within sink organs. *Plant Biotechnol J* 2010; 8: 966–78.

6. Vincze E., Reeves J.M., Lamping E., Farnden K.J., Reynolds P.H. Repression of the L-asparaginase gene during nodulate development in *Lupinus angustifolius*. *Plant Mol Biol* 1994; 26: 303–11.
7. Fait A., Angelovici R., Less H., Ohad I., Urbanczyk-Wochniak E., Fernie A.R., Galili G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant physiology*. *J Plant Physiol* 2006; 142: 839–54.
8. Credali A., García-Calderón M., Dam S., Perry J., Díaz-Quintana A., Parniske M., et al. The K⁺-dependent asparaginase, NSE1, is crucial for plant growth and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 2013; 54: 107–18.
9. UmaMaheswari T., Hemalatha T., Sankaranarayanan P., Puvanakrishnan R. Enzyme Therapy: Current Perspectives. *Indian J Exp Biol* 2016; 54: 7–16.
10. Panosyan E.H., Seibel N.L., Martin-Aragon S., Gaynon P.S., Avramis I.A., Sather H., et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 217–26.
11. Larson R.A., Fretzin M.H., Dodge R.K., Schiffer C.A. Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 660–5.
12. Woo M.H., Hak L.J., Storm M.C., Sandlund J.T., Ribeiro R.C., Rivera G.K., et al. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1525–32.
13. Avramis V.I., Sencer S., Periclou A.P., Sather H., Bostrom B.C., Cohen L.J., et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 2002; 99: 1986–94.
14. Batool T., Makky E.A., Jalal M., Yusoff M.M. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. *Appl Biochem Biotechnol* 2016; 178: 900–23.
15. Hung Wei-Lun, Joon Hyuk Suh, Yu Wang. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *J Food Drug Anal* 2016; 25 (1): 71–83.
16. Henriksen L.T., Harila-Saari A., Ruud E., Abrahamsson J., Pruunsild K., Vaitkeviciene G., et al. PEG-asparaginase allergy in children with acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL2008 protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 427–33.
17. Salzer W., Seibel N., Smith M. Erwinia asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 1407–14.
18. Huby R.D.J., Dearman R.J., Kimber I. Why Are Some Proteins Allergens? *Toxicol Sci* 2000; 55: 235–46.
19. Lin C.H., Chen C.H., Lin Z.C., Fang J.Y. Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers. *J Food Drug Anal* 2017; 25 (2): 219–34.
20. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 1870–4.
21. Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M., Clamp M., Barton G.J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009; 25: 1189–91.
22. Doytchinova I.A., Flower D.R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 4.
23. Saha S., Raghava G.P.S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: W202–W209.
24. Ivanciuc O., Mathura V., Midoro-Horiuti T., Braun W., Goldblum R.M., Schein C.H. Detecting potential IgE-reactive sites on food proteins using a sequence and structure database, SDAP-food. *Journal of agricultural and food chemistry* 2003; 51 (16): 4830–7.
25. Dimitrov I., Naneva L., Doytchinova I., Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics* 2014; 30: 846–51.
26. Dimitrov I., Flower D.R., Doytchinova I. AllerTOP – a server for in silico prediction of allergens. *BMC Bioinformatics* 2013; 14: S4.
27. Saha S., Raghava G.P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 2006; 65: 40–8.
28. Ponomarenko J., Bui H.H., Li W., Füsseder N., Bourne P.E., Sette A., Peters B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 514.
29. Aghaiypour K., Bahreini E., Jafari S. Bioinformatic Analysis of L-Asparaginase II from *Citrobacter freundii* 1101, *Erwinia chrysanthemi* DSM 4610, *E. coli* BL21 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. *Int J Med Lab* 2017; 4: 123–34.
30. Michalska K., Bujacz G., Jaskolski M. Crystal structure of plant asparaginase. *J MOL BIOL* 2006; 360: 105–16.
31. Bejger M., Imiolczyk B., Clavel D., Gilski M., Pajak A., Marsolais F., Jaskolski M. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾ exchange switches the catalytic apparatus of potassium-dependent plant L-asparaginase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014; 70: 1854–72.
32. Kersey P.J., Allen J.E., Allot A., Barba M., Boddu S., Bolt B.J., et al. Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res* 2017: gkx1011–gkx1011.
33. Vogel M., Lawson M., Sippl W., Conrad U., Roos W. Structure and Mechanism of Sanguinarine Reductase, an Enzyme of Alkaloid Detoxification. *J Biol Chem* 2010; 285: 18397–406.
34. Rosati F., Danza G., Guarna A., Cini N., Racchi M.L., Serio M. New Evidence of Similarity between Human and Plant Steroid Metabolism: 5 α -Reductase Activity in *Solanum malacoxylon*. *Endocrinology* 2003; 144: 220–9.
35. Mari A. Importance of databases in experimental and clinical allergology. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 88–96.
36. Schein C.H., Ivanciuc O., Braun W. Bioinformatics Approaches to Classifying Allergens and Predicting Cross-Reactivity. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27.
37. Verma A.K., Misra A., Subash S., Das M., Dwivedi P.D. Computational allergenicity prediction of transgenic proteins expressed in genetically modified crops. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011; 33: 410–22.

38. Sircar G., Saha B., Bhattacharya S.G., Saha S. In silico prediction of allergenic proteins. *Methods Mol Biol* 2014; 1184: 375–88.
39. Sander I., Flagge A., Merget R., Halder T.M., Meyer H.E., Baur X. Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2001; 107: 907–13.
40. Sudha V.T., Arora N., Gaur S.N., Pasha S., Singh B.P. Identification of a serine protease as a major allergen (Per a 10) of *Periplaneta americana*. *Allergy* 2008; 63: 768–76.
41. Li X., Yang H.W., Chen H., Wu J., Liu Y., Wei J.F. In silico prediction of T and B cell epitopes of Der f 25 in *Dermatophagoides farinae*. *Int J Genomics* 2014.
42. Mehla K., Ramana J. Surface proteome mining for identification of potential vaccine candidates against *Campylobacter jejuni*: an in silico approach. *Funct Integr Genomics* 2017; 17: 27–37.
43. Sollner J., Grohmann R., Rapberger R., Perco P., Lukas A., Mayer B. Analysis and prediction of protective continuous B-cell epitopes on pathogen proteins. *Immunome Res* 2008; 4: 1–17.
44. Zhao L., Wong L., Li J. Antibody-Specified B-Cell Epitope Prediction in Line with the Principle of Context-Awareness. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2011; 8: 1483–94.
45. Van Regenmortel MHV. Immunoinformatics may lead to a reappraisal of the nature of B cell epitopes and of the feasibility of synthetic peptide vaccines. *J Mol Recognit* 2006; 19: 183–7.
46. Leinikki P., Lehtinen M., Hyöty H., Parkkonen P., Kantanen M.L., Hakulinen J. Synthetic peptides as diagnostic tools in virology. *Adv Virus Res* 42 1993; 42: 149–86.
47. Laver W.G., Air G.M., Webster R.G., Smith-Gill S.J. Epitopes on protein antigens: Misconceptions and realities. *Cell* 1990; 61: 553–6.
48. Van Regenmortel M.H.V. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods* 1996; 9: 465–72.
49. Rubinstein N.D., Mayrose I., Halperin D., Yekutieli D., Gershoni J.M., Pupko T. Computational characterization of B-cell epitopes. *Mol Immunol* 2008; 45: 3477–89.
50. Potocnakova L., Bhide M., Pulzova L.B. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *J Immunol Res* 2016; 26 (4): 479–90.
51. Mahdavi M., Mohabatkar H., Keyhanfar M., Dehkordi A.J., Rabbani M. Linear and conformational B cell epitope prediction of the HER 2 ECD-subdomain III by in silico methods. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13 (7) : 3053–9.
52. Bayrami V., Keyhanfar M., Mohabatkar H., Mahdavi M., Moreau V. In silico prediction of B cell epitopes of the extracellular domain of insulin-like growth factor-1 receptor. *Mol Biol Res Commun* 2016; 5 (4): 201–14.
53. Dall'Antonia F., Gieras A., Devanaboyina S.C., Valenta R., Keller W. Prediction of IgE-binding epitopes by means of allergen surface comparison and correlation to cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2011; 128: 872–9 e878.
54. Jimenez-Lopez J.C., Lima-Cabello E., Melser S., Foley R.C., Singh K.B., Juan D. A. Lupin Allergy: Uncovering Structural Features and Epitopes of β -conglutin Proteins in *Lupinus Angustifolius* L. with a Focus on Cross-allergenic Reactivity to Peanut and Other Legumes. In: Ortuño F, Rojas I, eds. *Bioinformatics and Biomedical Engineering: Third International Conference, IWBBIO 2015, Granada, Spain, April 15–17, 2015, Proceedings, Part I*. Cham: Springer International Publishing, 2015: 96–107.
55. Kundu P., Biswas R., Mukherjee S., Reinhard L., Dutta A., Mueller-Dieckmann J., et al. Structure-based Epitope Mapping of *Mycobacterium tuberculosis* Secretory Antigen MTC28. *J Biol Chem* 2016; 291: 13943–54.
56. Mirza M.U., Rafique S., Ali A., Munir M., Ikram N., Manan A., et al. Towards peptide vaccines against Zika virus: Immunoinformatics combined with molecular dynamics simulations to predict antigenic epitopes of Zika viral proteins. *Sci Rep* 6 (2016): 37313.
57. Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K., Buus S., Lund O., Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 424.
58. Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K., Buus S., Brunak S., Lund O., Nielsen M. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2295–303.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-47-52

Опыт применения препарата брентуксимаб ведотин в лечении детей и молодых взрослых с первично-рефрактерным течением и рецидивами лимфомы Ходжкина

М.Н. Корсантия¹, Ю.Е. Романкова², Н.В. Мякова¹, А.В. Пшонкин¹¹ 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», Москва

В рамках международных мультицентровых рандомизированных исследований брентуксимаб ведотин (БВ) показал высокую эффективность у взрослых пациентов с первично-рефрактерными формами и рецидивами лимфомы Ходжкина (ЛХ). Группа населения детского и подросткового возраста, получавшая БВ, пока недостаточно велика для того, чтобы сделать выводы об эффективности и токсичности этого препарата. Цель работы: оценить результаты противорецидивной терапии препаратом БВ с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток у детей, подростков и молодых взрослых с первично-рефрактерными формами ЛХ и у пациентов с рецидивами заболевания. Данное исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В исследование было включено 54 пациента с первично-рефрактерным течением и рецидивами ЛХ, проходящих терапию, включающую БВ в различных режимах введения: в составе блока ВВ (n = 42) или в монотерапии (n = 12), в НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России в период с 2012 по 2019 год. Среди этих пациентов 24 (44,4%) мальчика и 30 (55,6%) девочек в возрасте от 4 до 25 лет на момент постановки диагноза ЛХ (средний возраст – 13,8 ± 4,4 года). Полный ответ был достигнут у 44 (81,4%) пациентов, получавших БВ (37 человек – блок ВВ; 7 – монотерапию БВ). В связи с прогрессией/рефрактерностью ЛХ 7 (12,9%) человек были переведены на терапию ингибиторами PDL1 (ниволумаб, пембролизумаб); 3 (5,7%) пациентов потеряны из-под наблюдения. В нашем исследовании токсичность наблюдалась у 4 (7,4%) пациентов, получавших БВ в составе блока ВВ: гематологическая токсичность 4-й степени (n = 3) и инфекционные осложнения в виде мукозита (n = 1). При использовании БВ в монотерапии нежелательных эффектов не отмечено. Применение БВ у детей, подростков и молодых взрослых с первично-рефрактерным течением и рецидивами ЛХ показало высокую эффективность и не сопровождается значительной токсичностью.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, дети, рецидив, первично-рефрактерное течение, методы лечения, брентуксимаб ведотин, ниволумаб, пембролизумаб, бендамустин

Корсантия М.Н. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 47–52.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-47-52

The experience of using the Brentuximab vedotin in the treatment of children and young adults with primary refractory course and relapses of Hodgkin's lymphoma

M.N. Korsantya¹, Y.E. Romankova², N.V. Myakova¹, A.V. Pshonkin¹¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow² Lomonosov Moscow State University, Moscow

In many international studies, brentuximab vedotin (BV) has been shown to be highly effective in adult patients with primary refractory forms or recurrent Hodgkin's lymphoma (HL). The group of children and adolescents received BV is not sufficient yet to assess the effectiveness and toxicity as in adults. In multicenter randomized trials BV was shown to be highly effective in adult patients. Aims: to evaluate the effectiveness and toxicity of anti-relapse therapy with BV followed by hematopoietic stem cell transplantation in children, adolescents and young adults with primary refractory forms of Hodgkin's Lymphoma (HL) and in patients with relapses of the disease. This study was approved by the Independent Ethical Committee and the Academic Council of Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. In the 2012–2019 period 54 patients with primary refractory course and relapses of LH (Hodgkin's Lymphoma) were enrolled, among them 24 (44.4%) boys and 30 (55.6%) girls aged 4 to 25 years at the time of diagnosis of HL (average age–13.84 years). Therapy included BV as a part of block BB (brentuximab vedotin, ribomustin, dexamethasone) (n = 44) and BV monotherapy (n = 12). Complete response was achieved for 44 (81.4%) patients (pts) received BV (as a part of block BB – 37 pts and as monotherapy – 7 pts). Seven (12.9%) among 54 patients were transferred to therapy with PDL1 inhibitors (nivolumab, pembrolizumab) due to progression/refractoriness. Three (5.7%) patients were lost from observation. In our study, toxicity was observed in 7.4% of patients (n = 4) received brentuximab as a part of block BB: grade 4 hematological toxicity (n = 3) and infectious complications in the form of mucositis (n = 1). There was no evidence of any toxicity among pts received BV as monotherapy. BV in children, adolescents and young adults with primary refractory course and relapses of LH had shown high efficiency, which was not accompanied by significant toxicity.

Key words: Hodgkin's Lymphoma, children, relapse, primary refractory course, treatment methods, brentuximab vedotin, nivolumab, pembrolizumab, bendamustine

Korsantya M.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 47–52.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-47-52

© 2020 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 14.01.2020

Принята к печати 18.02.2020

Контактная информация:

Корсантия Майя Нугзаровна, врач-гематолог отделения стационара кратковременного лечения НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: korsantyamaya@mail.ru

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 14.01.2020

Accepted 18.02.2020

Correspondence:

Maya N. Korsantya, MD, Hematologist at the Outpatient department of 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: korsantyamaya@mail.ru

Лимфома Ходжкина (ЛХ) – это редкое злокачественное заболевание лимфатической системы, субстратом которого являются клетки Ходжкина и Рид–Штернберга. У первично диагностированных пациентов с классической ЛХ прогноз очень благоприятный, более 80% из них отвечают на терапию первой линии [1–3]. При этом у 5% взрослых пациентов на ранней стадии заболевания и у 30–40% пациентов на продвинутой стадии наблюдается рецидив после проведения терапии первой линии [4, 5]. У детей благодаря современному лечению 5-летняя выживаемость достигает более 85%, остальные пациенты, к сожалению, остаются первично-рефрактерными или рецидивируют [6].

В педиатрическую практику при рефрактерных и рецидивных формах ЛХ активно внедряются новые и эффективные методы терапии – иммуноконъюгаты или «*checkpoint*» ингибиторы, однако оптимальная тактика терапии первично-рефрактерной ЛХ до сих пор не разработана [7].

Основной подход в терапии поздних рецидивов ЛХ – высокодозная химиотерапия (ВДХТ) второй линии (BEACOPP, ABVD, CEP, B-CAV, CEVD, Dexamethasone, BEAM), а при первично-рефрактерных и ранних, то есть химиорезистентных рецидивах предпочтительнее проведение иммунотерапии с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

В последние десятилетия в медицинскую практику постепенно внедряются препараты химиоиммуноконъюгатов, представляющие собой соединение антитела с цитостатиком (ADC – *antibody-drug conjugate*). Это привело к значительному прогрессу в терапии некоторых видов рака, например, злокачественных лимфопролиферативных новообразований, таких как ЛХ, неходжкинские лимфомы, рак молочной железы. Такие препараты предназначены для обеспечения высокоселективного уничтожения опухолевых клеток, при этом минимально воздействуя на нормальные здоровые клетки организма [8–11]. Один из наиболее перспективных препаратов в лечении ЛХ – брентуксимаб ведотин (БВ) – конъюгат антитела к CD30 и антитубулинового агента монометилауристатина Е (ММАЕ).

CD30 – член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), который, по-видимому, является маркером активированных лимфоцитов и имеет лишь ограниченную экспрессию в нормальных клетках. Интересно, что CD30 участвует как в пролиферации клеток, так и в противоположном процессе – апоптозе. Высокий уровень экспрессии CD30 в клетках ЛХ в сочетании с его относительно ограниченным присутствием в нормальных тканях делает его привлекательной молекулярной мишенью. Его важность в патофизиологии ЛХ предполагает также

потенциальную терапевтическую мишень для блокировки передачи сигналов CD30, что реализовано при разработке нового препарата БВ [12]. CD30 – идеальная мишень для терапии на основе ADC, учитывая высокий уровень его экспрессии на специфических опухолевых клетках (включая классические клетки HL и ALCL) и ограниченную экспрессию на нормальных клетках, преимущественно активированных В- и Т-клетках. Кроме того, CD30 последовательно экспрессируется на клетках HL и ALCL, независимо от стадии заболевания и линии терапии [13]. При взаимодействии антитела с CD30-рецепторами на клетках опухоли происходит высвобождение ММАЕ, который разрушает микротубулярную сеть клеток опухоли и приводит к их гибели (*рисунок*).

Брентуксимаб ведотин – это оптимальная эффективная терапевтическая опция для пациентов с ЛХ, получивших ВДХТ и либо рефрактерных к ней, либо нуждающихся в закреплении ремиссии перед проведением ТГСК [14–16]. Известно, что применение БВ в режиме монотерапии позволяет получить общий полный ответ (полная и частичная ремиссии) в 75% случаев, в том числе полную ремиссию – в 34% [17].

Во 2-й фазе клинических исследований среди 102 пациентов, которые рецидивировали после ауто-ТГСК, получивших в терапии БВ, полная ремиссия была достигнута у 34% пациентов; объем опухоли сократился у 94% пациентов; медиана выживаемости до прогрессирования заболевания составила 5,6 мес. Среди пациентов, которые полностью ответили на терапию БВ, трехлетняя общая выживаемость и безрецидивная выживаемость составили 73 и 58% соответственно. Среди побочных реакций отмечена только периферическая нейропатия [18]. Эти данные стали основанием для регистрации брентуксимаба ведотина для лечения взрослых пациентов с рефрактерной или рецидивной ЛХ с последующей ауто-ТГСК, а также для пациентов, рефрактерных после нескольких линий терапии и ауто-ТГСК.

В исследовании 3-й фазы (AETHERA) продемонстрировано, что применение БВ после ауто-ТГСК у пациентов, у которых отсутствовала ремиссия перед ауто-ТГСК, наблюдался очень ранний рецидив или первично-рефрактерное течение, улучшает их выживаемость.

Во многих международных исследованиях БВ показал свою высокую эффективность у взрослых пациентов. Группа населения детского и подросткового возраста, получавшая БВ, пока недостаточно изучена для того, чтобы оценить эффективность и токсичность терапии с применением БВ. В связи с этим важны исследования по применению этого препарата в первой линии терапии или при рецидиве после проведения алло-ТГСК у детей, подростков и молодых взрослых [19].

Бендамустин – уникальный алкилирующий препарат, который также стимулирует апоптоз и вызывает митотическую «катастрофу», то есть имеет свойства как алкилирующего соединения, так и анти-метаболита, что и выделяет его среди других алкилирующих агентов [20]. Бендамустин с 1960-х годов применялся у пациентов с индолентными неходжкинскими лимфомами, хроническим лимфолейкозом и ЛХ. В исследованиях 2-й фазы среди 36 пациентов с рецидивными и рефрактерными формами ЛХ общий уровень ответа составил 53%, что свидетельствует о бендамустине как о хорошей терапевтической опции для пациентов с рефрактерной и рецидивной ЛХ перед консолидирующим курсом ТГСК [21].

Учитывая результаты, полученные при применении БВ и бендамустина, можно предположить, что их совместное применение будет эффективным вариантом терапии. Такие протоколы для рецидивных

форм ЛХ уже существуют: бендамустин в дозе 90 мг/м², 1–2-й дни, и брентуксимаб ведотин – 1,8 мг/кг, 1 день в 3-недельном цикле. Уровень достижения полной ремиссии при этой комбинации составил 82%, а общий ответ – 94% [22].

Цель исследования: оценить эффективность и токсичность противорецидивной терапии с использованием БВ с последующей ТГСК у детей, подростков и молодых взрослых с первично-рефрактерными формами лимфомы Ходжкина и у пациентов с рецидивами заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Рисунок

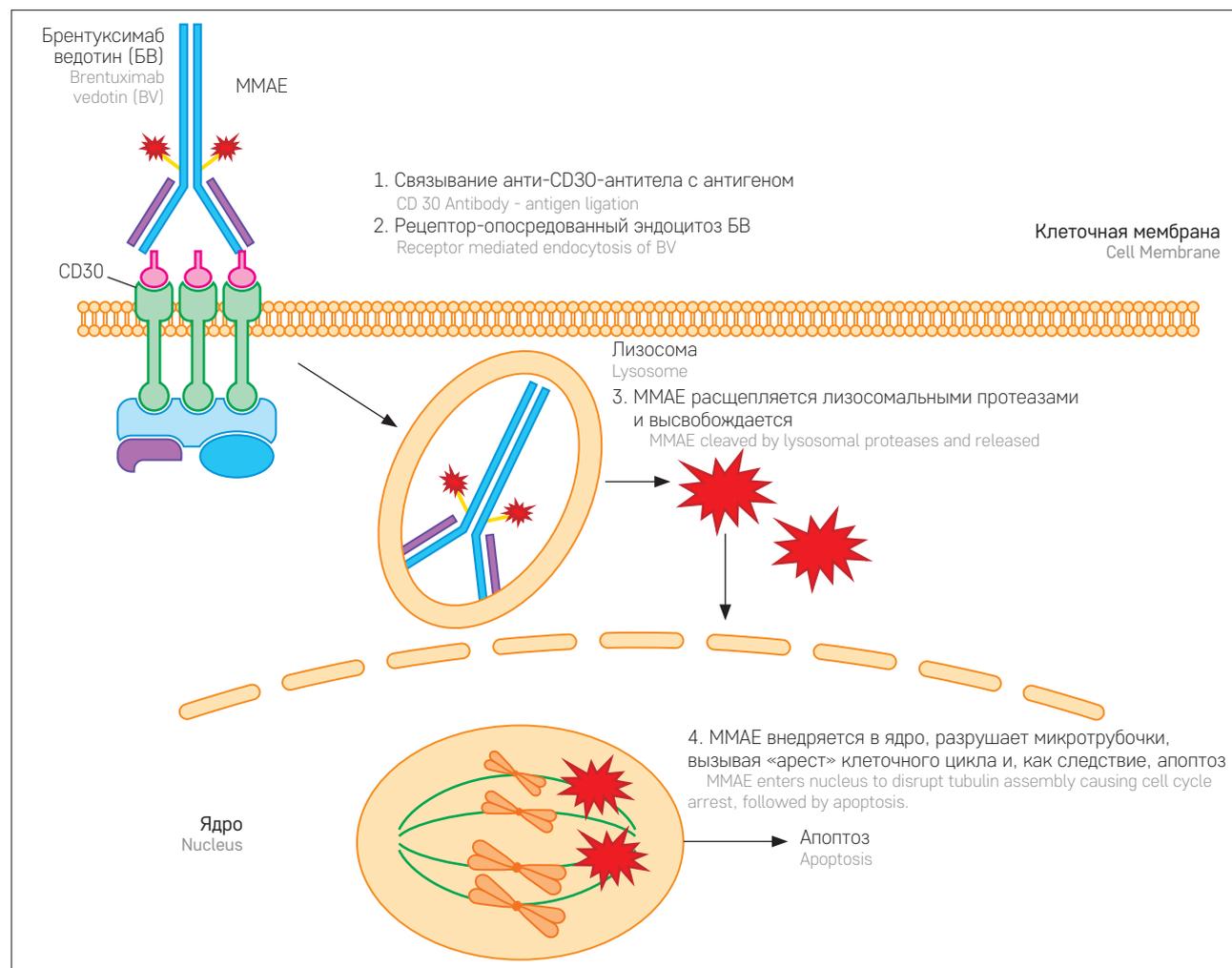
Механизм действия препарата брентуксимаб ведотин

БВ связывается с CD30 на поверхности опухолевых клеток, он транспортируется в лизосому посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза в виде комплекса ADC-CD30. Впоследствии MMAE высвобождается в цитоплазму в результате цепочки реакций разложения белка. Затем MMAE проникает в ядро, где связывается с тубулином, разрушая внутриклеточную микротрубочковую сеть и вызывает остановку клеточного цикла. В результате происходит апоптоз CD30-экспрессирующих опухолевых клеток.

Figure 1

Brentuximab vedotin mechanism of action

As an antibody for CD30, BV then enters cell via endocytosis. In the lysosome, the cytotoxin monomethyl auristatin E gets released. When MMAE enters the nucleus, it disrupts mitosis at the microtubulin level, causing apoptosis.



В клиническое исследование были включены 54 пациента (24 мальчика и 31 девочка) с первично-рефрактерным течением и рецидивами ЛХ, проходивших терапию, включавшую БВ в разных режимах введения, в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с 2012 по 2019 год. Возраст пациентов на момент постановки диагноза ЛХ – от 4 до 25 лет (средний возраст – $13,8 \pm 4,4$ года). Характеристики пациентов представлена в *таблице 1*.

Таблица 1
Характеристики пациентов
Table 1
Patient's characteristics

Параметр Attribute	Количество пациентов; n = 54 The number of patients; n = 54
Первично-рефрактерное течение Primarily refractory course	27 (50%)
Ранние рецидивы Early relapse	26 (29,6%)
Поздние рецидивы Late relapse	11 (20,4%)

Всем 54 (100%) пациентам изначально и в рецидиве проводили биопсию пораженного лимфоузла с последующими морфологическим и иммуногистохимическим исследованиями.

В рамках противорецидивной терапии 38 (70,4%) пациентам провели блоки IGEV (1–4 курса); остальные получили блоки CHOP и DHAP. В рамках данного исследования использовали комбинацию: брентуксимаб ведотин + дексаметазон + бендамустин (блок ВВ), а также монотерапию БВ.

Схема блока ВВ:

Брентуксимаб ведотин: 1,8 мг/кг, внутривенно, за 30 мин, в 1-й день курса. У пациентов с массой тела более 100 кг дозу рассчитывают на 100 кг массы тела. Препарат разводят в 250 мл физиологического раствора или 5%-й глюкозы. В случае токсичности предусмотрена коррекция дозы.

Бендамустин: 120 мг/м², внутривенно капельно, за 60 мин, во 2–3-й дни курса. Препарат разводят в 0,9%-м растворе NaCl.

Дексаметазон: 20 мг/м², внутривенно капельно, за 1 ч, в 1–3-й дни курса; дозу можно разделить на два введения.

Блоки ВВ, от 1 до 6 введений в дозе, провели 42 (77,8%) пациентам, большинство из них получили 3 курса (3 введения БВ); последующий цикл начинали на 22-й день от окончания предыдущего. Остальные 12 пациентов получали БВ в режиме монотерапии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полный ответ на терапию ВВ был достигнут у 37 из 42 пациентов; в дальнейшем они получили ауто-ТГСК, алло-ТГСК или гапло-ТГСК (*таблица 2*). Алло-ТГСК выполнена двум пациентам: у одного был ранний рецидив после ауто-ТГСК, второй – подросток с первичным иммунодефицитом, установленным после терапии ВВ. Кроме того, из 12 человек, которые получили БВ в монорежиме, 7 пациентов вышли в полную ремиссию и получили ауто-ТГСК; у двоих отмечена стабилизация состояния, они находятся под наблюдением; двое выпали из-под наблюдения; у одного пациента зарегистрирована прогрессия основного заболевания.

Таблица 2
ТГСК после курсов блока ВВ
Table 2
HSCT after BB courses

Параметр Attribute	Количество пациентов, n = 42 The number of patients, n = 42
Ауто-ТГСК Auto HSCT	32 (76,1%)
Алло-ТГСК (ПИД) Allo HSCT	2 (4,7%)
Гапло-ТГСК Haplo HSCT	3 (7,2%)
Прогрессия Progression	1 (2,4%)
Неизвестно Unknown	3 (7,2%)
Ждет ТГСК Waiting for HSCT	1 (2,4%)

Таблица 3
Токсичность препарата брентуксимаб ведотин после курсов блока ВВ
Table 3
BV toxicity after BB courses

Параметр Attribute	Количество пациентов n = 4 (7,4%) The number of patients, n = 4 (7,4%)
Гематологическая токсичность 2–3-й ст. Hematological toxicity 2–3 degrees	3 (75%)
Инфекционные осложнения (мукозит 2–3-й ст.) Infectious complication (mucositis 2–3 degrees)	1 (25%)

Суммарно из 54 человек, получивших БВ в составе блока ВВ или в монотерапии, полный ответ достигнут у 44 (81,4%). В связи с прогрессией/рефрактерностью основного заболевания 7 (12,9%) пациентов перевели на терапию ингибиторами PDL1 (ниволумаб, пембролизумаб, бендамустин). Выбыли из-под наблюдения 3 (5,7%) пациента.

Противоопухолевая активность препарата БВ не сопровождается значительной токсичностью, которая характерна для большинства схем ПХТ, – это важное свойство данного препарата. В нашем исследовании токсичность наблюдалась у 4 (7,4%) пациентов, получавших противорецидивную терапию, включавшую БВ (таблица 3). При этом у 3 пациентов наблюдалась гематологическая токсичность 4-й степени; у одного – инфекционные осложнения в виде мукозита, а не периферическая нейропатия, наиболее часто встречающаяся в других исследованиях [23, 24]. У 12 пациентов, которые получили БВ в монорежиме, токсичность не наблюдалась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для взрослых пациентов с первично-рефрактерным течением и рецидивами ЛХ стандартом терапии по-прежнему остается ауто-ТГСК. Залогом успеха ее проведения является достижение ремиссии до ТГСК и снижение токсичности терапии. Однако не все пациенты могут получить вторую и последующие ремиссии с помощью только химиотерапии второй линии. Возможная опция для них – применение таргетных препаратов, таких как БВ, действующих на различные патогенетические механизмы развития ЛХ. Возможность комбинировать эти подходы может стать решающим фактором успешной борьбы с рецидивами и рефрактерными формами ЛХ.

На сегодняшний день исследования, посвященные терапии пациентов детского возраста с первично-рефрактерной ЛХ и рецидивами ЛХ, немногочисленны. С одной стороны, это объясняется хорошими результатами терапии первой линии, а с другой – в целом медленным внедрением новых препаратов в практику детской онкогематологии. Исследования по применению БВ у детей с первично-рефрактерным течением и рецидивами ЛХ крайне необходимы для дальнейшего внедрения данного препарата в детскую онкогематологию.

Во многих исследованиях сообщается о токсичности 1–2-й степени как наиболее частой, что противоречит нашим данным о наличии токсичности 4-й степени у пациентов в нашей выборке. При анализе данных случаев мы пришли к выводу, что гематологическая токсичность была обусловлена предшествующей токсичной ВДХТ и тяжелыми инфекционными осложнениями, что повлекло за собой длительные аплазию кроветворения и восстановление функций костного мозга. Кроме того, токсичность могла быть связана с применением бендамустина в составе блоков ВВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинация брентуксимаб ведотин + бендамустин крайне эффективна в терапии рецидивирующей и рефрактерной ЛХ у детей и обладает низкой гематологической токсичностью [25]. У подавляющего большинства пациентов ауто-ТГСК проведена всего лишь после трех курсов ВВ при условии полной метаболической ремиссии по данным позитронной-эмиссионной томографии. Брентуксимаб ведотин эффективен у детей и молодых взрослых с первично-рефрактерным течением и рецидивами ЛХ, а главное – не сопровождается значительной токсичностью, которая характерна при проведении большинства схем противорецидивной полихимиотерапии у детей и молодых взрослых, что позволяет рассматривать БВ в качестве терапии рефрактерных и ранних рецидивов ЛХ у детей и подростков в России.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при спонсорской поддержке благотворительного фонда «Подари жизнь».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Korsantya M.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7837-6890>

Romankova Y.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7977-8998>

Myakova N.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4779-1896>

Pshonkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>

Литература

1. Siddiqi T., Thomas S.H., Chen R. Role of brentuximab vedotin in the treatment of relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Pharmacogenom Pers Med* 2014; 7: 79–85.
2. Deng C., Pan B., O'Connor O.A. Brentuximab vedotin. *Clin Cancer Res* 2013; 19 (1): 22–7.
3. Montanari F., Diefenbach C. Relapsed Hodgkin lymphoma: management strategies. *Curr Hematol Malig Rep* 2014; 9 (3): 284–93.
4. Francisco J.A., Cerveny C.G., Meyer D.L., Mixan B.J., Klussman K., Chace D.F., et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-mono-

- thyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 2003; 102 (4): 1458–65.
5. Okeley N.M., Miyamoto J.B., Zhang X., Sunderson R.J., Benjamin D.R., Sievers E.L., et al. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (3): 888–97.
 6. Schellong G., Dorfell W., Claviez A., Corhols D., Mann G., Scheel-Walter H.G., et al. Salvage therapy of progressive and recurrent Hodgkin's disease: results from a multicenter study of the pediatric DAL/GPOH-HD study group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6181–9. DOI: 10.1200/JCO.2005.07.930.
 7. Wu H.B., Yeh S.A., Chen H.Y. Brentuximab vedotin treatment for primary refractory Hodgkin lymphoma. *Case Rep Hematol* 2013 Oct 2; 2.
 8. Senter P.D., Sievers E.L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol* 2012; 30 (7): 631–7.
 9. Domingo-Domenech E., Comai A., Sureda A. Brentuximab vedotin in relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma. *Eur Oncol Haematol* 2015; 11 (1): 21–4.
 10. Engert A. CD30-positive malignant melanomas: time for a change of management? *Haematologia (Budap)* 2013; 98 (8): 1165–8.
 11. Jagadeesh D., Smith M.R. Antibody drug conjugates: changing the treatment landscape of lymphoma. *Curr Treat Options Oncol* 2016; 17: 55.
 12. Mei M., Thomas S., Chen R. Management of relapsed or refractory Hodgkin lymphoma with second-generation antibody-drug conjugates: focus on brentuximab vedotin. *BioDrugs* 2014; 28 (3): 245–51.
 13. European Medicines Agency. ADCETRIS 50 mg powder for concentrate for solution: summary of product characteristics. 2016. <http://www.ema.europa.eu/>. Accessed 11 Oct 2016.
 14. Gibb A., Jones C., Bloor A., Kulkarni S., Illidge T., Linton K., et al. Brentuximab vedotin in refractory CD30+ lymphomas: a bridge to allogeneic transplantation in approximately one quarter of patients treated on a Named Patient Programme at a single UK center. *Haematologica* 2013; 98 (4): 611–4.
 15. Iqbal N., Kumar L., Iqbal N. Update on salvage options in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma after autotransplant. *ISRN Oncol* 2014; 605691.
 16. Illidge T., Bouabdallah R., Chen R., Gopal A.K., Moskowitz C.H., Ramchandren R., et al. Allogeneic transplant following brentuximab vedotin in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2015; 56 (3): 703–10.
 17. Gopal A.K., Chen R., Smith S.E., Ansell S.M., Rosenblatt J.D., Savage K.J., et al. Durable remissions in a pivotal phase 2 study of brentuximab vedotin in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015; 125 (8): 1236–43. DOI: 10.1182/blood-2014-08-595801
 18. Younes A., Gopal A.K., Smith S.E., Ansell S.M., Rosenblatt J.D., Savage K.J., et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2012 Jun 20; 30 (18): 2183–9.
 19. Moskowitz C.H., Nademanee A., Masszi T., Aqura E., Holowiecki J., Abidi M.N., et al. AETHERA Study Group. Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2015; 385 (9980): 1853–62.
 20. Gandhi V. Metabolism and mechanisms of action of bendamustine: rationales for combination therapies. *Semin Oncol* 2002; 29: 4–11.
 21. Moskowitz A.J., Hamlin P.A.Jr., Perales M.-A., Gerecitano J., Horwitz S.M., Matasar M.J., et al. Phase II study of bendamustine in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2013; 31 (4): 456–60.
 22. O'Connor O.A., Lue J.K., Sawas A., Amenqual J.E., Deng C., Kalac M., et al. A Phase 1-2 study of brentuximab vedotin (Bv) and bendamustine (B) in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma (HL) and anaplastic large T-cell lymphoma (ALCL). *Blood* 2014; 124 (21): 3084.
 23. Ansell S.M. Brentuximab vedotin. *Blood* 2014; 124 (22): 3197–200.
 24. Younes A., Gopal A.K., Smith S.E., Ansell S.M., Rosenblatt J.D., Savage K.J., et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2012; 30 (18): 2183–9.
 25. LaCasce A.S., Bociek R.G. Brentuximab vedotin plus bendamustine: a highly active first salvage regimen for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; 132 (1): 40–8.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57

Влияние режима приема дексаметазона на выявление нормальных В-клеточных предшественников в костном мозге у детей с острым лимфобластным лейкозом на момент окончания индукционной терапии

Е.В. Михайлова¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Ю.В. Румянцева¹, О.И. Илларионова¹,
А.А. Семченкова¹, Л.Г. Фечина^{2,3}, А.И. Карачунский¹, 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

Мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) методом проточной цитометрии на момент окончания индукционной терапии – один из основных способов оценки прогноза при лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). При лейкозах из В-клеточных предшественников (ВП–ОЛЛ) определение МОБ данным методом бывает затруднено из-за схожести иммунофенотипа лейкоэмических и нормальных клеток. Деинтенсификация индукционной терапии может приводить к более частому появлению в костном мозге нормальных ВП, что существенно усложняет мониторинг МОБ. Целью исследования была оценка частоты появления в костном мозге нормальных ВП на 36-й день терапии по протоколу ОЛЛ-МБ 2015 в зависимости от режима приема глюкокортикоидов (ГК). Исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В исследование были включены 220 пациентов с ВП–ОЛЛ, рандомизированных на две группы в зависимости от типа индукционной терапии: постоянный прием дексаметазона ($n = 139$) и перерыв в приеме дексаметазона между 15-м и 22-м днями лечения ($n = 81$). На 36-й день терапии проводили определение МОБ в пунктате костного мозга методом проточной цитометрии с подсчетом процента лейкоэмических клеток и нормальных ВП. Для схемы индукции с интермиттирующим приемом дексаметазона на 36-й день терапии установлен более высокий процент ВП(+)-образцов по сравнению со схемой с непрерывным приемом ГК (43,2 и 27,3% соответственно; $p = 0,016$). При сравнении процентного содержания ВП в ВП(+)-образцах в случае применения схемы лечения с интермиттирующим приемом дексаметазона равновероятно выявляли ВП на разных стадиях созревания; при непрерывном приеме ГК чаще обнаруживали только наиболее ранние ВП с процентным содержанием менее 0,01%. Снижение интенсивности лечения ОЛЛ приводит к заметному увеличению доли нормальных ВП в костном мозге уже на момент окончания индукционной терапии. Большее количество ВП(+)-образцов костного мозга усложняет выявление МОБ в связи со схожестью иммунофенотипа ВП и лейкоэмических клеток.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, дексаметазон, индукционная терапия

Михайлова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 53–57.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57

The influence of a dosage regimen of dexamethasone on detection of normal B-cell precursors in the bone marrow of children with BCP-ALL at the end of induction therapy

E.V. Mikhailova¹, T.Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, J.V. Roumiantseva¹, O.I. Illarionova¹, A.A. Semchenkova¹,
L.G. Fechina^{2,3}, A.I. Karachunskiy¹, A.M. Popov¹

¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow
² Regional Children Clinical Hospital No 1; Ekaterinburg
³ Research Institute of Medical Cell Technologies; Ekaterinburg

Minimal residual disease (MRD) monitoring by flow cytometry at the end of induction therapy is one of the key ways of a prognosis assessment in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). In B-cell precursor ALL (BCP-ALL), this method of MRD detection is complicated due to the immunophenotypic similarity between leukemic cells and normal B-cell precursors (BCPs). A decrease in intensity of induction therapy can lead to a more frequent appearance of normal BCPs in the bone marrow, which significantly complicates the MRD monitoring. Aim: to assess the incidence of normal BCPs in bone marrow on the 36th day of induction therapy with two different regimens of glucocorticoid (GC) administration according to ALL-MB 2015 protocol. This study was approved by the Independent Ethical Committee and the Academic Council of Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. The study included 220 patients with BCP-ALL who were randomized to two types of GC-based induction therapy: a continuous

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 23.12.2019
Принята к печати 29.01.2020

Контактная информация:

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

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 23.12.2019
Accepted 29.01.2020

Correspondence:

Alexander M. Popov, MD, PhD, Head of Hemoblastosis immunophenotyping laboratory of the Department of pediatric oncological surgery 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: uralcytometry@gmail.com

administration of dexamethasone (n = 139) and an intermittent regimen with a 1-week dexamethasone therapy stop (n = 81). On the 36th day of induction therapy, MRD and normal BCPs were quantified in bone marrow samples by flow cytometry. On the 36th day of treatment, 43.2% of BCP(+) samples were established in the intermittent-therapy group, and 27.3% in the continuous-therapy group (p = 0.016). Comparison of the BCP level in BCP(+) samples revealed the more equitable distribution of BCPs at different developmental stages in the intermittent-therapy group, meanwhile mainly the immature BCPs in a quantity of less than 0.01% were found in the continuous-therapy group. Reduced-intensity induction therapy for patients with BCP-ALL leads to a noticeable increase of normal BCPs in bone marrow at the end of this treatment stage. A higher rate of BCP(+) bone marrow samples hinder the MRD detection due to the immunophenotypic similarity of BCPs and leukemic cells.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, dexamethasone, remission induction

Mikhailova E.V. et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 53–57.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57

За последние десятилетия достигнуты серьезные успехи в терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей [1]. Однако, несмотря на это, далеко не во всех случаях удается достичь желаемого эффекта, а именно добиться устойчивой продолжительной ремиссии. Эффективная индукционная терапия – важный компонент результативного лечения острых лейкозов. От эффективности данного этапа лечения, в частности, зависит прогноз в каждом конкретном клиническом случае [2]. Важным компонентом индукционной терапии уже более полувека являются глюкокортикостероиды (ГКС). Один из побочных эффектов применения стероидных препаратов на кроветворение – уничтожение не только опухолевых, но и нормальных лимфоидных клеток-предшественников [3]. В связи с этим возникает необходимость коррекции гормональной терапии таким образом, чтобы при уменьшении дозовой нагрузки эффективность лечения не снижалась.

В клинической практике существуют критерии, по которым можно оценить степень ответа пациентов на противоопухолевую терапию. Один из таких критериев – величина минимальной остаточной болезни (МОБ) на различных этапах лечения. Величина МОБ на определенном этапе терапии в совокупности с другими прогностическими факторами позволяет стратифицировать пациентов по группам риска для определения схемы лечения в рамках определенного протокола [4]. Для мониторинга МОБ используются такие методы, как цитогенетический анализ, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), высокопроизводительное секвенирование и многоцветная проточная цитометрия [5, 6]. Последний метод благодаря своей высокой чувствительности и доступности получил широкое распространение в лабораторной практике [7]. Однако в некоторых случаях при определении МОБ могут возникать трудности при разделении пула лейкоэмических клеток и нормальных В-клеточных предшественников (ВП). Неоднократно было показано, что детектируемое восстановление В-лимфопоэза в подавляющем большинстве случаев начинается уже после окончания индукционной терапии [8], поэтому нормальные ВП обычно не препятствуют цитометрическому определению МОБ

в наиболее прогностически важных точках наблюдения (середина и окончание индукционной терапии) [8]. Однако благодаря совершенствованию терапии ОЛЛ уже на самых ранних этапах лечения пациентов могут появляться ВП. Один из методов модификации индукционной терапии – изменение режима дозирования ГКС, которое предусматривает отказ от непрерывного введения данных препаратов. Подобное изменение в схеме лечения потенциально может снизить его токсичность и ускорить процесс регенерации кроветворения, тем самым оказывая влияние на более раннее появление ВП в костном мозге пациентов. В связи с этим повышается риск получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов при определении МОБ методом проточной цитометрии, причем чем больше ВП содержится в образце, тем выше риск [9].

Цель данного исследования: оценить частоту появления нормальных ВП на момент окончания индукционной терапии в костном мозге в зависимости от режима приема глюкокортикоидных препаратов у пациентов с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП–ОЛЛ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. В исследование были включены 220 пациентов в возрасте от 1 до 18 лет с ВП–ОЛЛ, проходившие лечение в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России и Областной детской клинической больницы г. Екатеринбурга с 2015 по 2019 год.

В рамках используемого протокола лечения ВП–ОЛЛ для пациентов терапевтических групп А, В и 1221-SR/IR предусмотрено два типа индукционной терапии: схема с перерывом в приеме дексаметазона между 15-м и 22-м днями лечения (далее – схема *Dexa intermittent*) и более традиционная схема с приемом дексаметазона на протяжении всей индукционной терапии (далее – схема *Dexa constant*). Среди пациентов, включенных в исследование, лечение по схеме *Dexa intermittent* получили 81 человек, по

схеме *Dexa constant* – 139 человек.

По окончании индукционной терапии проводили определение МОБ в пунктате костного мозга пациентов методом многоцветной проточной цитометрии. По полученным точечным графикам определяли процент опухолевых клеток и нормальных ВП.

Определение МОБ производили на цитометрах FACS Canto II (3 лазера, 8 цветов; *Becton Dickinson*, США) и Navios (3 лазера, 10 цветов; *Beckman Coulter*, США). Окрасивание образцов выполняли согласно методике, разработанной в рамках протоколов группы «Москва–Берлин» [10]. Анализ скаттерграмм осуществляли при помощи программного обеспечения *Kaluza 2.1* (*Beckman Coulter*, США). Для выявления нормальных ВП использовали особенности их расположения на точечных графиках [11]. На количественном уровне величину МОБ и ВП оценивали как процентное содержание от ядродержащих клеток в образце. Образец костного мозга считался ВП- или МОБ-положительным при уровне ВП или МОБ более 0,001%. Статистическую обработку результатов проводили по количественному критерию Манна–Уитни и качественному критерию χ^2 с поправкой Йетса с использованием программного обеспечения *Statistica*. Достоверными считали различия при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование образцов костного мозга 220 пациентов на 36-й день терапии показало, что в 73 (33,2% всех исследуемых образцов) из них содержится более 0,001% нормальных ВП. Установлено также, что в 43,2% образцов от пациентов, лечившихся по схеме *Dexa intermittent*, на конец индукционной терапии в костном мозге присутствовали нормальные ВП; при схеме лечения *Dexa constant* эта цифра составила 27,3% ($p = 0,016$) (рисунк 1). Сравнение процентного содержания ВП в образцах от пациентов, находящихся на двух разных схемах индукционной терапии, не выявило достоверных различий (рисунк 2).

При исследовании количества МОБ(+)-образцов было выявлено, что частота их встречаемости не отличается: в группе *Dexa intermittent* МОБ(+)-образцы составила 27,16%, в группе *Dexa constant* – 26,62% ($p = 0,931$). Обнаружено также, что некоторые ВП(+)-образцы одновременно являются и МОБ-позитивными. При схеме лечения *Dexa intermittent* таких образцов было 6 (17,14% всех ВП(+)-образцов данной группы); при схеме *Dexa constant* – тоже 6 (15,79% всех ВП(+)-образцов данной группы) ($p = 0,877$). Кроме того, установлено, что в 16,44% ВП(+)-образцов костного мозга имеются также опухолевые клетки; среди ВП(-)-образцов их процент выше – 31,97% ($p = 0,015$).

При разделении ВП(+)-образцов на подгруппы по процентному содержанию ВП оказалось, что в группе *Dexa constant* распределение неравномерное: самой многочисленной здесь оказалась подгруппа с 0,005–0,0099% ВП (12 образцов) (рисунк 3). Выделение тех же подгрупп в группе *Dexa intermittent* показало, что образцы сравнительно равномерно распределены по процентному содержанию ВП в них.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В более ранних исследованиях неоднократно было показано, что интенсивность полихимиотерапии при лечении ВП–ОЛЛ непосредственно влияет

Рисунок 1

Частота встречаемости ВП(+)-образцов костного мозга в зависимости от схемы лечения пациентов (в столбцах указано количество образцов)

Figure 1
The frequency rate of BCP(+) BM samples in two different dexamethasone regimens (the number of patients is indicated in the column center)

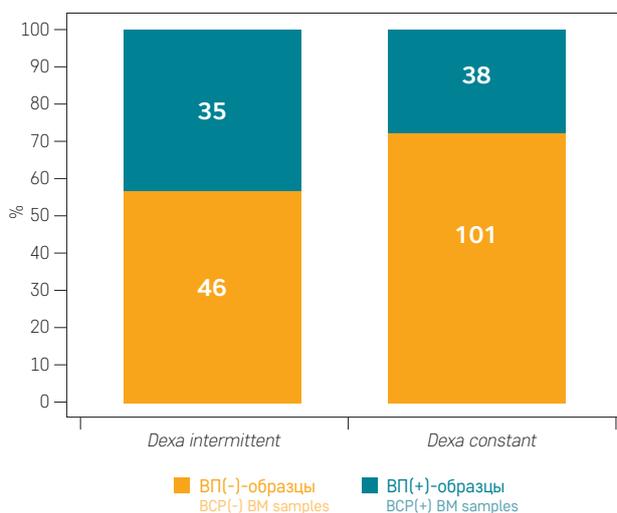


Рисунок 2

Процентное содержание ВП в ВП(+)-образцах костного мозга в двух исследуемых группах

Figure 2
BCP level in BCP(+) BM samples of two investigated groups

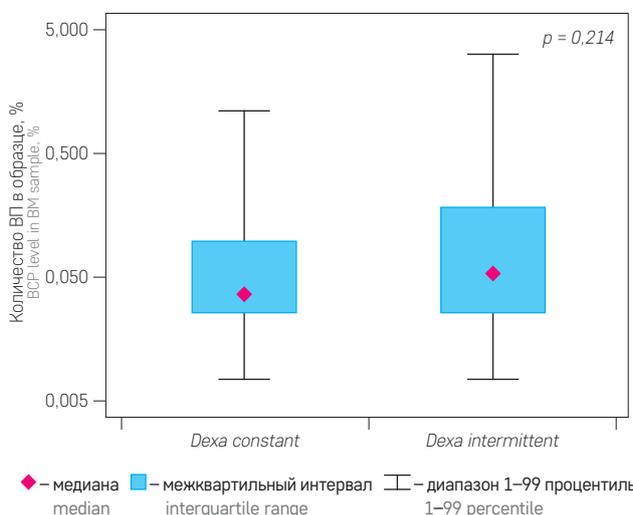
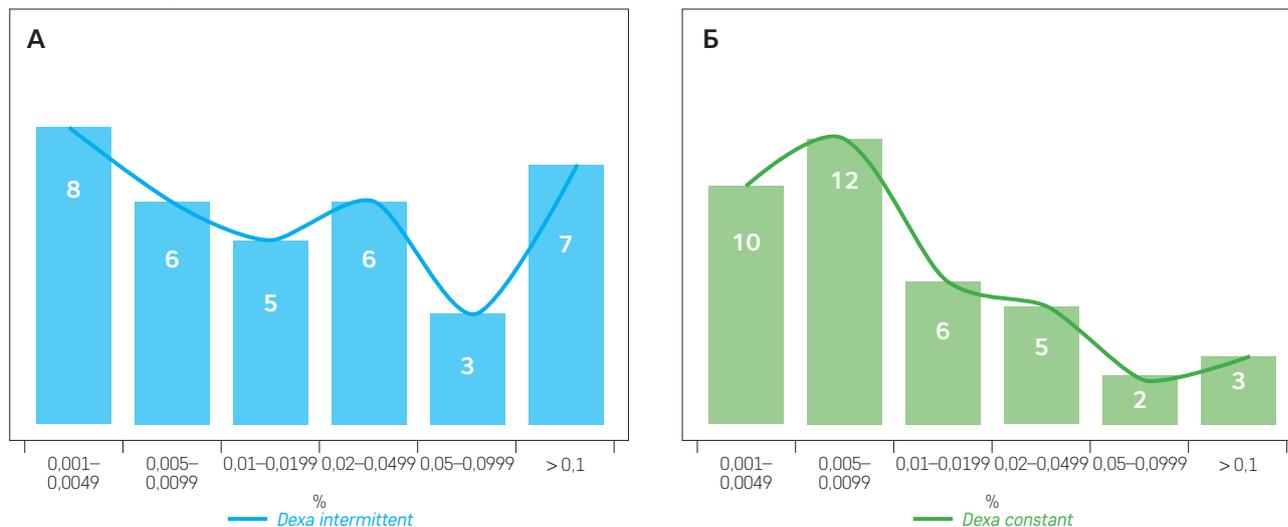


Рисунок 3

Распределение ВП(+)-образцов костного мозга в группах *Dexa constant* (А) и *Dexa intermittent* (Б) в зависимости от процентного содержания ВП (в столбцах указано количество образцов)

Figure 3

Distribution of BCP(+) BM samples of *Dexa constant* group (А) and *Dexa intermittent* group (Б) according to the BCP percentage (the number of samples is indicated in the column center)



на скорость появления ВП в костном мозге пациентов [9, 12, 13]. В исследовании ALL-BFM 95 продемонстрировано, что по окончании индукционной терапии (33-й день для данного протокола лечения) в костном мозге пациентов полностью отсутствуют нормальные ВП [8]. В исследовании в рамках протокола ALL-MB 2008 показало, что на 36-й день терапии, по данным проточной цитометрии, частота встречаемости ВП(+)-образцов костного мозга составляет не более 10% [12]. В нашем исследовании установлен более высокий уровень частоты встречаемости ВП(+)-образцов в конце индукционной терапии – 33,18%. Помимо этого, было установлено, что вероятность обнаружения опухолевых клеток в конце индукционной терапии в образцах костного мозга, содержащих ВП, существенно ниже, чем в образцах без ВП.

Более высокая частота встречаемости ВП(+)-образцов костного мозга наблюдается в группе *Dexa intermittent* по сравнению *Dexa constant*. Очевидно, что регенерация В-клеточного звена кроветворения более интенсивно протекает у пациентов, находящихся на индукционной терапии с паузой в приеме дексаметазона. Вероятно, перерыв в гормональной терапии положительно влияет на способность костного мозга к восстановлению. При этом не теряется и эффективность индукционной терапии по отношению к опухолевым клеткам: частота встречаемости МОБ(+)-образцов костного мозга в обеих группах варьирует незначительно.

Особого внимания заслуживает разница в распределении по процентному содержанию ВП-образцов костного мозга пациентов на разных схемах индукционной терапии. В группе *Dexa constant* наибольшее количество образцов содержало минимальные количества регенераторных клеток (до 0,01%) (рисунок 3).

Вероятно, это связано с тем, что постоянный прием ГКС на протяжении индукционной терапии сильнее угнетает гемопоэз и образование ВП, в связи с чем лишь к концу терапии начинают появляться первые регенераторные клетки с фенотипом CD10++ CD34+ CD19+ (BCP1 – по *Dworzak M.N., et al.* [14]). Пациенты группы *Dexa intermittent* подвергались меньшей курсовой нагрузке ГКС, что позволило регенерации В-клеточного звена кроветворения начаться несколько раньше. Результатом этого стало не только более равномерное распределение образцов костного мозга по процентному содержанию ВП внутри группы (рисунок 3), но также появление более зрелых предшественников лимфопоэза с фенотипом CD10+ CD34-CD19+ (BCP2 – по *Dworzak M.N., et al.* [14]). Все эти результаты согласуются с выводами из исследования *E.G. van Lochem* о том, что интенсивность индукционной терапии напрямую влияет на профиль ВП: чем выше лекарственная нагрузка на костный мозг, тем численно меньшим будет отношение процента более зрелых ВП к менее зрелым [9].

Более раннее появление ВП в костном мозге пациентов благодаря снижению дозовой нагрузки ГКС во время индукционной терапии может затруднить интерпретацию результатов определения МОБ методом проточной цитометрии. Известно, что лейкоэмические клетки могут частично повторять фенотип ВП, из-за чего на точечных графиках происходит наложение нормальных и опухолевых клеточных популяций [15, 16]. В условиях окончания циторедуктивной фазы лечения, когда крайне важно обнаружение лейкоэмических клеток в количестве сотых долей процента, при нахождении ВП в образце требуется особое внимание в интерпретации показателей определения МОБ во избежание получения ложноположительных результатов.

ВЫВОДЫ

Для схемы индукции с интермиттирующим приемом дексаметазона, по данным проточной цитометрии, на 36-й день терапии установлен более высокий процент ВП(+)-образцов, чем для схемы с непрерывным приемом ГКС. В конце индукционной терапии вне зависимости от схемы лечения встречаются образцы костного мозга, содержащие, помимо нормальных ВП, также лейкоэмические клетки. Вероятность обнаружения опухолевых клеток в конце индукционной терапии в образцах костного мозга, содержащих ВП, существенно ниже, чем в образцах без ВП. В случае применения схемы лечения с интермиттирующим приемом дексаметазона в костном мозге пациентов в конце индукционной терапии равновероятно могут содержаться ВП с различными стадиями созревания и процентным содержанием, а

при лечении по схеме с непрерывным приемом ГКС наиболее вероятно обнаружение ранних ВП с иммунофенотипом CD10⁺⁺ CD34⁺ CD19⁺ и процентным содержанием менее 0,01%. Большое количество ВП(+)-образцов костного мозга на 36-й день терапии усложняет диагностику МОБ в связи со схожестью иммунофенотипа ВП и лейкоэмических клеток.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

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

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

Semchenkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7082-1694>

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

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

Литература

1. Румянцев А.Г. Эволюция лечения острого лимфобластного лейкоза у детей. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского 2011; 95 (4): 11–22.
2. Panzer-Grümayer E.R., Schneider M., Panzer S., Fasching K., Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95 (3): 790–4.
3. Heasman S.J., Giles K.M., Ward C., Rossi A.G., Haslett C., Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *The Journal of endocrinology* 2003; 178 (1): 29–36.
4. Borowitz M.J., Devidas M., Bowman W.P., Carroll W.L., Chen I.M., Harvey R., et al. Prognostic Significance of Minimal Residual Disease (MRD) in Childhood B-Precursor ALL and Its Relation to Other Risk Factors. A Children's Oncology Group (COG) Study. *Blood* 2006; 108 (11): 219.
5. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *British journal of haematology* 2003; 121 (6): 823–38.
6. Kotrova M., Muzikova K., Mejstrikova E., Novakova M., Bakardjieva-Mihaylova V., Fiser K., et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood* 2015; 126 (8): 1045–7.
7. Moppett J., Burke G.A.A., Steward C.G., Oakhill A., Goulden, N.J. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Journal of clinical pathology* 2003; 56 (4): 249–53.
8. Dworzak M.N., Fröschl G., Printz D., Mann G., Pötschger U., Mühlegger N., et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99 (6): 1952–8.
9. Van Lochem E.G., Wiegers Y.M., Van Den Beemd R., Hählen K., Van Dongen J.J.M., Hooijkaas H. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. *Leukemia* 2000; 14 (4): 688–95.
10. Попов А.М., Белевцев М.В., Боякова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Фадеева М.С., и др. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы. *Онкогематология* 2016; 11 (4): 64–73.
11. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г., Шестопалов А.В., Плясунова С.А. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2016; 9 (3): 302–13.
12. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шорилов Е.В., Цвиренко С.В., Савельев Л.И. и др. Ограниченная возможность применения упрощенного подхода для определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. *Клиническая лабораторная диагностика* 2011; 3: 25–9.
13. Van Wering E.R., Van der Linden-Schreier B.E., Szczepański T., Willems M.J., Baars E.A., Van Wijngaarde-Schmitz H.M., et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. *British journal of haematology* 2000; 110 (1): 139–46.
14. Dworzak M.N., Fritsch G., Fleischer C., Printz D., Fröschl G., Buchinger P., et al. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. *Leukemia* 1997; 11 (8): 1266–73.
15. Gaipa G., Basso G., Maglia O., Leoni V., Faini A., Cazzaniga G., et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005; 19 (1): 49–56.
16. Lucio P., Parreira A., Van den Beemd M.W.M., Van Lochem E.G., Van Wering E.R., Baars E., et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13 (3): 419–27.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 15.11.2019
Принята к печати 23.12.2019

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-58-67

Иммунологические особенности В-линейных предшественников на 15-й день терапии острого лимфобластного лейкоза у детей. Сопоставление протоколов оценки минимальной остаточной болезни и собственные результаты

О.А. Чернышева, И.Н. Серебрякова, Н.А. Купрышина, Е.Н. Шолохова, М.А. Шервашидзе, Б.В. Курдюков, А.В. Попа, Н.Н. Тупицын

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Контактная информация:
Чернышева Ольга Алексеевна, канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунологии гемопоза НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.
Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
E-mail: dr.chernysheva@mail.ru

Оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) на 15-й день терапии острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников (В-ОЛЛ) у детей имеет ключевое значение в прогнозе заболевания. При оценке МОБ необходимо учитывать особенности первичного иммунофенотипа опухолевых В-лимфобластов. Для оценки МОБ в середине терапии индукции ремиссии (15-й день лечения) предложены несколько иммунологических подходов, имеющих общую концепцию, но отличающихся принципиально важными деталями. Цель данной работы: проанализировать сложившиеся проточно-цитометрические (ПЦ) протоколы основных исследовательских групп (*Berlin-Frankfurt-Munster Group*, *госпиталь St. Jude*, *Children's Oncology Group*) и сопоставить их данные с собственными результатами при оценке в соответствии с различными подходами. Исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено Ученым советом НИИ Клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. В исследование включили 131 больного с В-ОЛЛ в возрасте от 1 года до 17 лет (медиана – 5,53 года). Преобладал пре-пре-В-иммуноподвариант (92,4% случаев). У всех больных на 15-й день проведено морфологическое (подсчет миелограммы) и иммунологическое (оценка МОБ) исследование костного мозга. При сопоставлении ПЦ-протоколов оценки МОБ на 15-й день показано, что CD10 – более надежный критерий выявления В-ЛП по сравнению с CD34. Экспрессия CD45 может служить дополнительным критерием детекции В-ОЛЛ. Пересчет на мононуклеарную фракцию – более жесткий критерий определения МОБ. Научная новизна исследования состоит в том, что впервые на 15-й день терапии проведено подробное сопоставление данных ПЦ с цитологической картиной костного мозга: впервые показано, что не все В-ЛП, выявленные на основании CD10⁺/CD19⁺/CD34⁺/CD45^{low}, aberrантны по CD58/CD38. **Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия, В-линейные предшественники, иммунофенотип

Чернышева О.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 58–67.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-58-67

Immunological features of B-linear progenitors on the 15th day of acute lymphoblastic leukemia therapy in children. Comparison of minimal residual disease assessment protocols and own results

O.A. Chernysheva, I.N. Serebryakova, N.A. Kupryshina, E.N. Sholokhova, M.A. Shervashidze, B.V. Kurdyukov, A.V. Popa, N.N. Tupitsyn

N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center, Moscow

Evaluation of minimal residual disease (MRD) on the 15th day of treatment of acute lymphoblastic leukemia from B-linear precursors (B-ALL) in children is of key importance in the prognosis of the disease. When evaluating the MRD, it is necessary to take into account the features of the primary immunophenotype of tumor B-lymphoblasts. To assess the MRD on the 15th day of treatment several immunological approaches have been proposed that have a general concept, but differ in fundamentally important details. The purpose of this work was to analyze the established flow cytometry (FC) protocols of the main research groups (*Berlin-Frankfurt-Munster Group*, *St. Jude Hospital*, *Children's Oncology Group*) and to compare the results evaluated according to those approaches. This study was approved by the Independent Ethical Committee N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center. The study included 131 patients with B-ALL aged 1 to 17 years (median 5.53). Pre-Pre-B immunosubvariant prevailed (92.4%). A morphological (myelogram count) and immunological (MRD assessment) study of the BM was performed in all patients on the 15th day. Comparing the FC protocols of the MRD on the 15th day, it was shown that CD10 was a more reliable criterion for the detection of B-LP in comparison with CD34. The expression of CD45 may serve as an additional criterion for the detection of B-LP. The recalculation of the mononuclear cells is a more stringent criterion for determining the MRD. The scientific novelty is that for the first time on the 15th day, a detailed comparison of flow cytometry data with a cytological picture of the bone marrow was carried out. It was shown for the first time that not all B-LP detected on the basis of CD10⁺/CD19⁺/CD34⁺/CD45^{low} are aberrant according to CD58/CD38.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, B-linear progenitors, immunophenotype

Chernysheva O.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 58–67.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-58-67

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 15.11.2019
Accepted 23.12.2019

Correspondence:
Olga A. Chernysheva, PhD, laboratory of hematopoiesis immunology, N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center.
Address: Russia 115478 Moscow, Kashirskoye sh., 24
E-mail: E-mail: dr.chernysheva@mail.ru

Минимальная остаточная болезнь (МОБ) при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) у детей как один из основных критериев риск-стратификации и факторов прогноза заболевания включена в большинство современных лечебных программ [1–3]. В зависимости от этапа терапии оценка количества клеток МОБ решает определенные клинические задачи. Так, в середине терапии индукции ремиссии количество клеток МОБ в костном мозге (КМ) наиболее полно отражает первичный ответ на лечение [4], в то время как клиренс бластов на 8-й день – это только ответ на стероиды [5]. При этом было установлено, что большое значение имеет эффект первой линии терапии [6]. Важно отметить, что интенсивность проводимых режимов полихимиотерапии приводила к развитию серьезных долговременных побочных эффектов и перелеченности больных [7–12]. Таким образом, именно с учетом МОБ на 15-й день стало возможным выявление группы больных с хорошим ответом на терапию, которым можно снизить дозы антрациклинов с целью уменьшения частоты развития осложнений и улучшения качества жизни [13, 14]. В настоящее время редукция доз антрациклинов с учетом количества клеток МОБ на 15-й день индукционной химиотерапии предусмотрена протоколами группы BFM (протокол BFM-ALL-IC 2009).

В зависимости от этапа лечения иммунологические подходы к оценке МОБ различны. Это обусловлено закономерными процессами, протекающими в костном мозге под действием системной терапии. Уникальна с иммунологической точки зрения ситуация, формирующаяся к середине терапии индукции ремиссии (15-й день). Основу лечения на данном этапе составляет системное введение глюкокортикостероидов. В экспериментальных работах показана высокая чувствительность В-линейных предшественников (В-ЛП) к кортикостероидам [15]. Кроме того, у больных с ОЛЛ из Т-линейных предшественников, а также с опухолями мозга показана полная элиминация CD19-позитивных В-ЛП (CD34⁺/CD10⁺), либо их количество не превышало 0,01% к концу индукционной химиотерапии [16].

На данный момент в клинической практике сформировались несколько подходов к оценке МОБ методом многопараметровой проточной цитометрии (ПЦ) при В-ОЛЛ у детей. Они разработаны примерно в одно и то же время, но каждый подход имеет свои особенности. Сопоставление иммунологических панелей антител (АТ) представлено в *таблице 1* [1, 17].

В большинстве случаев В-ЛП имеют CD19⁺CD10⁺ иммунофенотип. Данная комбинация антител включена во все ПЦ-протоколы детекции МОБ. В-лимфобласты характеризуются также экспрессией

стволовоклеточного антигена CD34, который присутствует в панелях детекции МОБ всех исследовательских групп.

Протокол госпиталя St. Jude разработан как упрощенный для стран с ограниченными ресурсами и позволяет выявить остаточные бласты в середине индукционной химиотерапии (15–19-й дни). С учетом доказанной чувствительности нормальных В-ЛП к стероидам [15] и их отсутствия в КМ к середине терапии индукции ремиссии достаточно определить с количеством CD19⁺CD10⁺ и/или CD34⁺ клеток. Несмотря на бурное развитие технических возможностей современной проточной цитометрии, позволяющих анализировать 12 и более параметров на одной клетке, соревнование в «многоцветности» не должно превалировать над выполнением клинической задачи данного исследования.

Исходя из задач МОБ-диагностики на 15-й день – определение количества остаточных бластов для риск-стратификации больных, трехцветный протокол госпиталя *St. Jude* может быть оптимальным для рутинной практики. Значительное преимущество данного протокола – простота выполнения, а следовательно, высокая воспроизводимость, низкая стоимость исследования и доступность для большинства клиник. Кроме того, эта

Таблица 1
Комбинации МКА для выявления клеток МОБ при В-ОЛЛ у детей, используемые различными исследовательскими группами

Table
Monoclonal antibody combinations for detection of minimal residual disease in children B-ALL used by various research groups

Протокол Protocol	Панель МКА Monoclonal antibody panel
Госпиталь <i>St. Jude</i> Hospital <i>St. Jude</i> (<i>Coustan-Smith E., et al.</i>)	CD19/CD10 и/или CD19/CD34 and/or
AIEOP-BFM-ALL 2009 (<i>Basso J., et al.</i>)	1. Syto16/CD10/CD45/CD19 2. CD20/CD10/CD34/CD19 3. CD58/CD10/CD45/CD19 4. CD10-CD20/CD38/CD45/CD19
COG (<i>Borowitz M., et al.</i>)	4-цветная 4-color 1. CD20/CD10/CD45/CD19 2. CD34/CD9/CD45/CD19 6-цветная 6-color 1. CD20/CD10/CD38/CD58/CD19/CD45 2. CD9/CD13+CD33/CD34/CD10/CD19/CD45

методика позволяет обойтись одной пробиркой – это важно, так как большинство образцов КМ на 15-й день индукционной химиотерапии – гипоклеточные, а набор необходимого количества клеток для достоверного анализа при использовании двух и более пробирок затруднен [17, 18]. Важно отметить, что подсчет остаточных бластов по протоколу госпиталя *St. Jude* ведется на моноклеарную фракцию КМ.

Протокол группы BFM оптимизирован для выявления МОБ на всех этапах терапии. Он позволяет не только определиться с количеством В-ЛП ($CD19^+CD10^+CD34^+CD20^-$), но и выявить aberrантный (лейкоз-ассоциированный) иммунофенотип (ЛАИФ) бластов на основании гиперэкспрессии CD58 и CD10. Таким образом, данный протокол достаточно универсален, но все же не позволяет учесть альтернативные ЛАИФ в случае отсутствия aberrантности по указанным антигенам [19].

Наиболее полно оценить ЛАИФ позволяет **протокол *Children's oncology group* (COG, США)**, в котором учтен анализ сочетания антигенов CD58 и CD38, наиболее часто используемого для оценки aberrантности. Возможен поиск остаточных бластов по коэкспрессии пан-миелоидных антигенов (CD13 и CD33), а также на основании молекулы CD9. Лечебный протокол группы COG подразумевает оценку количества клеток МОБ только в конце терапии индукции (29–33-й дни) и по окончании индукции консолидации (78-й день), но с учетом широты включенных в панель антигенов может быть применен и на 15-й день.

И протокол группы BFM, и протокол группы COG подразумевают подсчет количества остаточных бластов на все ядросодержащие клетки образца КМ (миелокарициты). Важная особенность КМ больных ОЛЛ в процессе терапии – его гипоклеточность, а также содержание значительного количества дебриса, появляющегося под влиянием химиотерапии. В лаборатории иммунологии гемопозза проведено исследование по оценке значения применения нуклеотропных красителей семейства *Syto* на 15-й день терапии ОЛЛ. В этой работе показана целесообразность их включения в проточно-цитометрическую панель для корректной оценки количества клеток МОБ [18].

Отдельный вопрос детекции МОБ – определение порогового уровня, то есть значения, выше которого образец КМ следует считать МОБ-позитивным. Так, пороговым считается уровень менее 17 лейкозных бластов/мкл, то есть с учетом средней клеточности образцов КМ – 0,01% на миелокарициты (10^{-4}) [5, 17]. Данная величина принята исследовательской группой BFM и учитывается в ее лечебных протоколах на всех этапах терапии как пороговый уровень

МОБ-негативности. В настоящее время с учетом возможностей многопараметровой ПЦ (оценка 12 и более параметров) и анализа большого количества клеток (2 млн и более) чувствительность метода достигает 10^{-5} – 10^{-6} и сопоставима с молекулярными методами [18, 20].

Учитывая разнообразие проточно-цитометрических протоколов по оценке МОБ, целью данного исследования было сопоставление предложенных алгоритмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено Ученым советом НИИ Клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

В исследование включен 131 больной В-ОЛЛ (64 мальчика и 67 девочек) в возрасте от 1 до 17 лет (медиана – 5,53 года), проходивший лечение в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» с 2007 по 2017 год. Диагноз устанавливали по совокупности морфоцитохимического и иммунофенотипического исследований пунктата КМ. Пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ был установлен в 92,4% случаев; про-В-вариант диагностирован у 10 больных. Во всех случаях на 15-й день лечения проводили морфологическое и иммунологическое (оценка МОБ) исследования пунктата КМ.

Подсчет миелограммы вели два морфолога (по 250 клеток) на мазках костного мозга, окрашенных по методу Романовского–Гимзе. Согласно стандартным морфологическим критериям по количеству бластных клеток выделяли М-варианты: М1 – образцы, в которых содержание бластных клеток не превышало 5,0%; М2 – образцы с количеством бластов от 5,0 до 25,0%; в образцах группы М3 – 25,0% и более бластных клеток.

Иммунологически клетки остаточной опухоли выявляли на основании экспрессии пан-В-клеточного антигена CD19 в сочетании с CD45, CD10 и CD34. Для сопоставления различных подходов к оценке количества клеток МОБ подсчет проводили с помощью двух алгоритмов: в пределах моноклеарной фракции образца (МНК) и в пределах ядросодержащих (*Syto+*) клеток (ЯСК) образца КМ. Проанализирован также иммунофенотип клеток МОБ в отношении основных маркеров aberrантности (CD58 и CD38).

Анализ проточно-цитометрических файлов проводили с использованием программного обеспечения *FCS Express v.3*; обработку статистических данных – при помощи статистического пакета *IBM-SPSS Statistics-17*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологический и иммунологический анализы пунктатов КМ вели параллельно из одной пробирки. Большинство больных (80,0%) с учетом морфологических критериев попали в группу M1 (< 5,0% бластных клеток в КМ), при этом в 9,2% пунктатов бластных клеток морфологически не выявлено. Группу M2 составили 19 больных, в образцах КМ

которых согласно морфологическим данным количество бластов варьировало от 5,0 до 25,0%. Группа M3 ($\geq 25\%$) – 7 больных, в образцах КМ которых выявили 25% и более бластных клеток. Распределение больных по уровням МОБ на 15-й день представлено в *таблице 2*. Важно, что 11 больных достигли МОБ-негативного статуса, а еще трое – порогового значения МОБ. Для этой группы больных может быть рассмотрен вопрос о снижении доз антрациклинов с учетом всех факторов прогноза.

Таблица 2

Распределение больных по уровням МОБ на 15-й день лечения

Table 2

Patient distribution by levels of minimal residual disease on the 15th day of therapy

Уровень МОБ, % MRD level, %	Среднее значение МОБ, % MRD mean value, %	Количество больных Number of patients
МОБ < 0,01 MRD < 0,01	0,027	11
МОБ = 0,01 MRD = 0,01	0,01	3
0,01 < МОБ < 0,1 0,01 < MRD < 0,1	0,055	30
0,1 ≤ МОБ < 1,0 0,1 ≤ MRD < 1,0	0,94	40
1,0 ≤ МОБ < 10,0 1,0 ≤ MRD < 10,0	3,89	32
МОБ ≥ 10,0 MRD ≥ 10,0	27,0	15

Сопоставление различных иммунологических протоколов оценки МОБ на 15-й день терапии.

Мы сопоставили подход, основанный на выявлении aberrантных (по CD58 и CD38) В-ЛП в пределах ЯСК, и протокол, определяющий клетки МОБ на основании CD10⁺ и/или CD34⁺ В-клеток в пределах МНК на 15-й день. Важно, что при сопоставлении результатов подсчета клеток МОБ в пределах ЯСК и в пределах МНК ситуация в целом значительно не менялась. Однако два пациента перешли из группы МОБ-негативности (< 0,01%) в группу МОБ-положительного статуса, оставшись при этом в группе стандартного риска. Изменение группы риска со стандартного на промежуточный установлено у 6 больных, чей уровень МОБ стал более 0,1% при пересчете на МНК. В группу высокого риска перешли 6 пациентов группы промежуточного риска.

Таким образом, подсчет в пределах МНК – более жесткий критерий риск-стратификации пациентов на 15-й день лечения.

Таблица 3

Сопоставление количества клеток МОБ, выявленных на основании экспрессии различных маркеров В-ЛП

Table 3

Comparison of MRD cells number identified by the expression of various BCPs markers

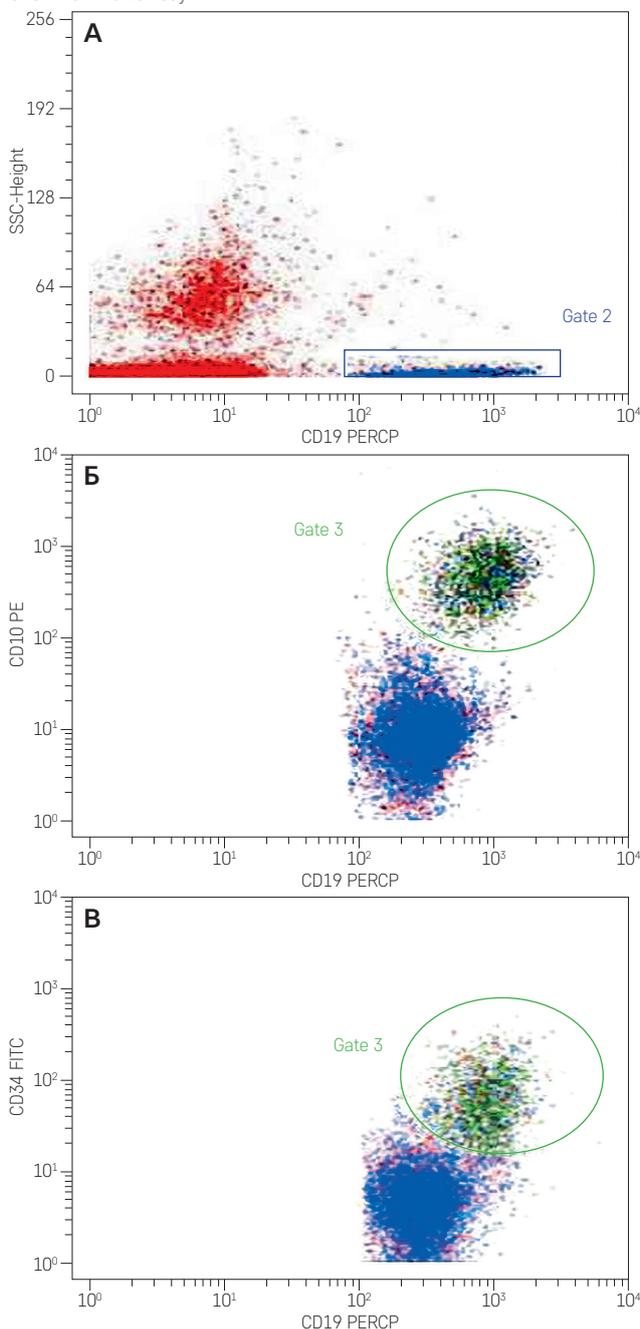
Параметр Parameter	Стандартный риск Standard risk group		Промежуточный риск Intermediate risk group		Высокий риск High risk group
	МОБ < 0,01 MRD < 0,01	0,01 < МОБ < 0,1 0,01 < MRD < 0,1	0,1 < МОБ < 1,0 0,1 < MRD < 1,0	1,0 < МОБ < 10,0 1,0 < MRD < 10,0	
Уровни МОБ, % MRD levels, %	МОБ < 0,01 MRD < 0,01	0,01 < МОБ < 0,1 0,01 < MRD < 0,1	0,1 < МОБ < 1,0 0,1 < MRD < 1,0	1,0 < МОБ < 10,0 1,0 < MRD < 10,0	МОБ ≥ 10,0 MRD ≥ 10,0
CD10, % от ЯСК CD10, % NC	0,003 ± 0,001 0,0–0,009 n = 11	0,05 ± 0,005 0,0–0,099 n = 31	0,3 ± 0,05 0,0–1,0 n = 34	4,3 ± 0,7 0,0–19,25 n = 31	24,3 ± 4,1 0,0–48,1 n = 12
CD34, % от ЯСК CD34, % NC	0,001 ± 0,0007 0,0–0,005 n = 8	0,03 ± 0,005 0,0–0,08 n = 22	0,2 ± 0,04 0,0–0,68 n = 28	1,7 ± 0,5 0,0–9,79 n = 22	16,1 ± 4,6 0,06–42,6 n = 9
CD45 ^{low/-} , % от ЯСК CD45 ^{low/-} , % NC	0,2 ± 0,09 0,0–0,5 n = 6	0,1 ± 0,05 0,0–0,7 n = 14	0,7 ± 0,2 0,0–2,94 n = 19	2,4 ± 0,5 0,0–9,0 n = 22	21,3 ± 6,2 0,0–59,8 n = 10
В-ЛП, % от ЯСК BCP, % NC	0,003 ± 0,001 0,0–0,009 n = 11	0,05 ± 0,005 0,01–0,099 n = 31	0,4 ± 0,04 0,1–0,81 n = 35	3,9 ± 0,4 1,02–9,88 n = 32	24,2 ± 3,2 10,5–48,1 n = 12
CD58/CD38, % от ЯСК CD58/CD38, % NC	0,001 ± 0,0007 0,0–0,003 n = 4	0,02 ± 0,01 0,0–0,092 n = 7	0,2 ± 0,1 0,02–0,6 n = 6	0,7 ± 0,5 0,0–3,8 n = 7	10,2 ± 6,6 0,009–27,5 n = 4

Рисунок 1

Пример совпадения количества В-ЛП, оцененных на основании экспрессии CD10 и CD34; пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ, CD34+ на 15-й день

Figure 1

Example of coincidence of the number of BCPs evaluated by expression of CD10 and CD34; pre-pre-B immunosubvariant of ALL, CD34+ on the 15th day



На цитограммах **A–B** представлен пример оценки В-ЛП на основании экспрессии антигенов CD10 и CD34: **A** – гейт В-клеток (gate 2, синий цвет) CD19⁺ (ось x) против параметров бокового светорассеяния (ось y); CD19⁺ В-клетки составили 11,81%; **B** – в пределах В-клеток определялись В-ЛП с отчетливой экспрессией CD10 (ось y) против CD19 (ось x) в количестве 2,52% (gate 3, зеленый цвет); **B** – CD19 (ось x) против CD34 (ось y); количество CD34-положительных В-клеток – 2,35% (gate 3, зеленый цвет).

On cytograms **A–B**, an example of BCP assessment based on expression of CD10 and CD34 antigens: **A** – B-cell gate (gate 2, blue) CD19⁺ (x axis) versus side scattering (y axis); CD19⁺ B cells accounted for 11.81%; **B** – BCP was detected within the B-cells by distinct expression of CD10 (y axis) against CD19 (x-axis) in the amount of 2.52% (gate 3, green); **B** – CD19 (x-axis) versus CD34 (y-axis); the number of CD34 positive B-cells – 2.35% (gate 3, green).

Иммунологические подходы к выявлению В-линейных предшественников в образцах костного мозга на 15-й день терапии

Определение В-ЛП основано на выявлении экспрессии антигенов CD10, CD34, CD45 и их сочетаний на CD19⁺В-клетках. Согласно ПЦ-протоколам группы BFM при оценке количества клеток МОБ всегда выбирают большее значение из всех В-ЛП, оцененных на основании экспрессии CD10, и/или CD34, и/или CD45.

В рамках этого исследования мы проанализировали экспрессию указанных антигенов на В-клетках на 15-й день терапии в зависимости от первичного иммунофенотипа опухоли. Проанализировано также количество клеток МОБ на основании каждого из маркеров клеток-предшественников (таблица 3).

Количество В-ЛП, выявленных на основании экспрессии CD10 и CD34, было сопоставлено в 88 образцах КМ больных с пре-пре-В-иммуноподвариантом ОЛЛ, анализируемых на 15-й день индукционной химиотерапии. В 43 (48,9%) образцах количество В-ЛП, оцененных на основании экспрессии CD10 и CD34, совпадало (рисунок 1). Однако 51 (57,9%) случай из 88 демонстрировал различие по данным параметрам. В 35 (39,8%) из 88 случаев преобладали CD10⁺ В-клетки, при этом CD34-негативными при первичной диагностике были только 21,6% случаев (рисунок 2). В 10 (11,3%) образцах КМ преобладали CD34⁺ В-ЛП (рисунок 3).

Экспрессия CD45 для выявления В-ЛП была оценена в 77 образцах КМ. При оценке количества В-ЛП по слабой экспрессии антигена CD45 или ее отсутствию установлено, что в большинстве случаев – в 47 (61%) из 77 – количество В-ЛП, выявленное на основании экспрессии CD10⁺CD34⁺ и CD45^{low/-}, совпадало (рисунок 4). Однако полного совпадения не получено, так как часть нормальных зрелых В-клеток слабее экспрессирует CD45 по сравнению с лимфоцитами. Таким образом, происходит некоторое завышение количества В-ЛП за счет нормальных зрелых В-клеток, слабо экспрессирующих антиген CD45. В группе высокого риска данные показатели совпали. При корреляционном анализе установлено, что количество CD10/CD34-положительных В-ЛП было достоверно прямо пропорционально числу CD45^{low/-} В-клеток ($R = 0,836$; $p < 0,0001$; $n = 77$). Таким образом, оценка количества В-ЛП, несомненно, должна производиться на основании экспрессии комбинации антигенов CD34, CD10 и CD45.

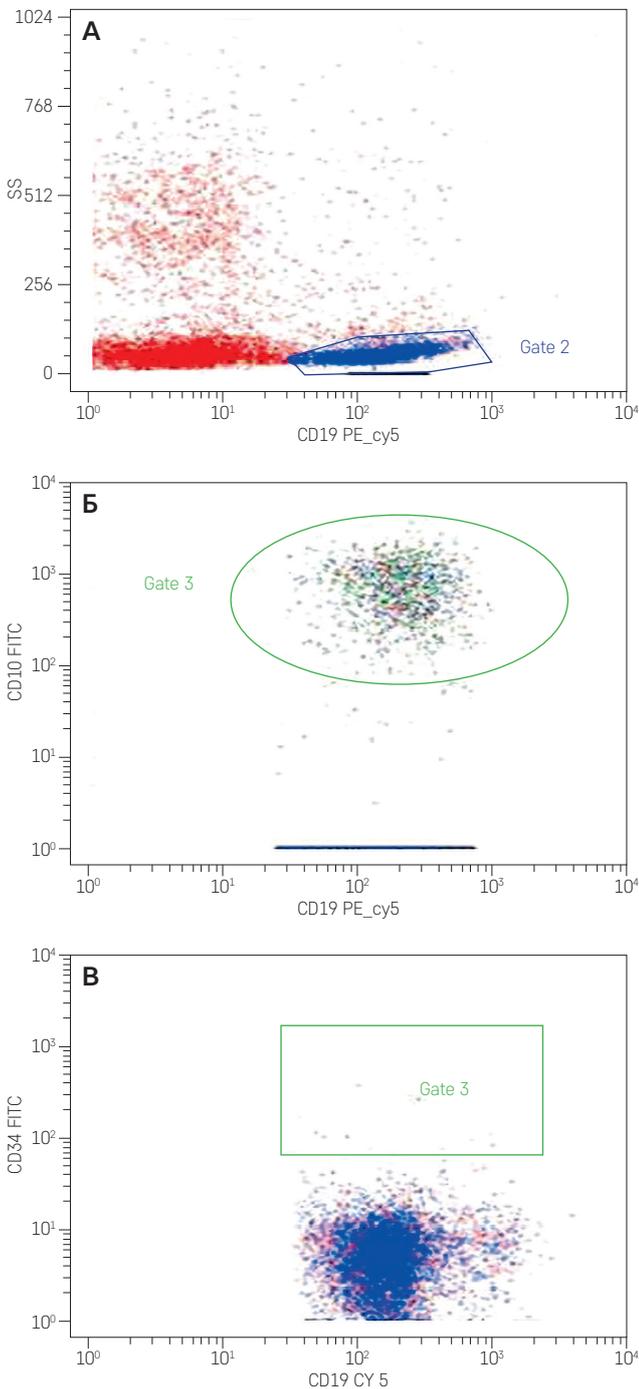
В случае про-В-иммуноподварианта, характеризующегося отсутствием экспрессии CD10, оценку количества В-ЛП проводили на основании числа TdT⁺суCD22⁺клеток (рисунок 5).

Рисунок 2

Пример преобладания CD10⁺ В-ЛП на 15-й день; пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ, CD10⁺CD34⁺

Figure 2

An example of the predominance of CD10-positive BCPs on day 15; pre-pre-B immunosubvariant of ALL, CD10⁺CD34⁺



Цитограмма **A**: выявление В-клеток на основании экспрессии CD19 (ось x) против параметров бокового светорассеяния (ось y) – gate 2, синий цвет. CD19⁺ В-клетки составили 18,2%. Цитограмма **Б**: в пределах В-клеток определялись В-ЛП с отчетливой экспрессией CD10 (ось y) против CD19 (ось x) в количестве 3,94% (gate 3, зеленый цвет). Цитограмма **В**: CD19 (ось x) против CD34 (ось y). Количество CD34-позитивных В-клеток – 0,13% (gate 3, зеленый цвет).

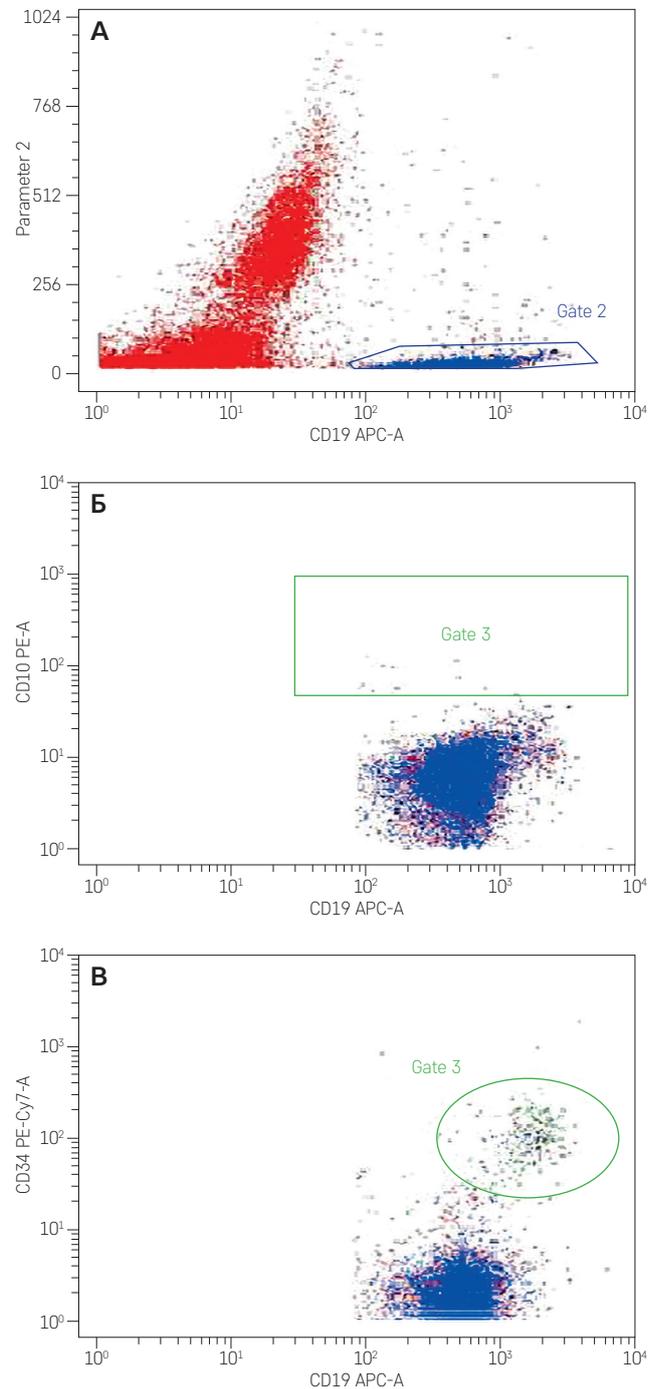
Cytogram **A**: detection of B-cells based on the expression of CD19 (x-axis) versus the parameters of side scattering (y axis) – gate 2, blue. CD19⁺ B-cells accounted for 18.2%. Cytoqram **B**: within the B-cells BCP with distinct expression of CD10 (y axis) against CD19 (x axis) in the amount of 3.94% (gate 3, green). Cytoqram **B**: CD19 (x axis) versus CD34 (y axis). The number of CD34-positive b-cells – 0.13% (gate 3, green).

Рисунок 3

Пример преобладания CD34⁺ В-ЛП на 15-й день; пре-пре-В-иммуноподвариант ОЛЛ с мономорфной экспрессией CD10 в дебюте

Figure 3

An example of the predominance of CD34-positive BCPs on day 15; pre-pre-B immunosubvariant of ALL with monomorphic expression of CD10 in debut



Цитограмма **A**: гейт В-клеток на основании экспрессии CD19 (ось x) против параметров бокового светорассеяния (ось y). Цитограмма **Б**: в gate CD19⁺ клеток выявляются единичные CD10⁺ В-линейные предшественники (gate 3, зеленый цвет); CD19 (ось x) против CD10 (ось y). Цитограмма **В**: CD19 (ось x) против CD34 (ось y); четко визуализируется кластер CD34⁺ В-клеток (gate 3, зеленый цвет) в количестве 0,57% от миелокариоцитов.

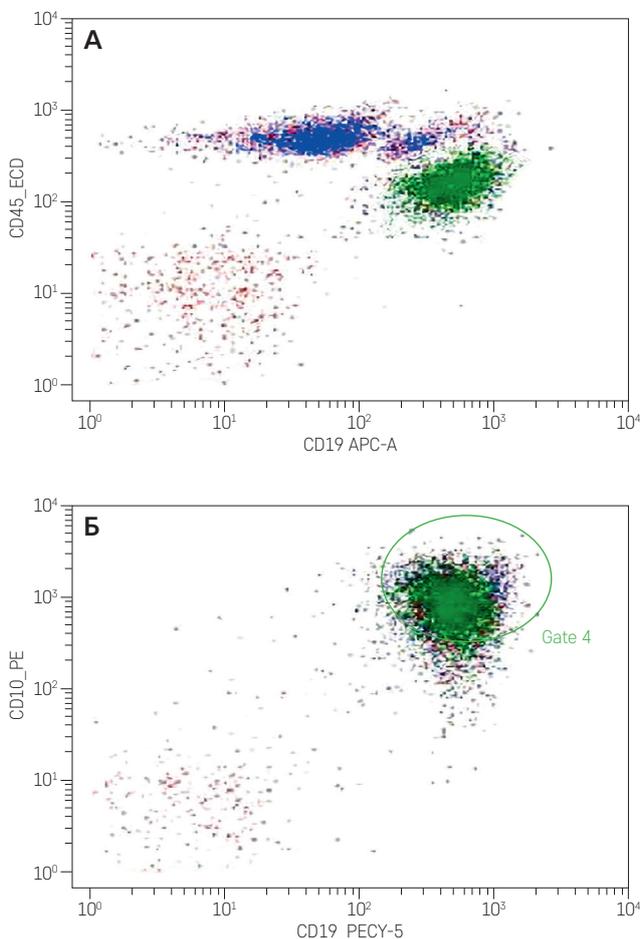
Cytogram **A**: B-cells gate based on expression of CD19 (x-axis) against side scattering parameters (y axis). Cytoqram **B**: in gate of CD19⁺ cells single CD10⁺ B-linear precursors are detected (gate 3, green color); CD19 (x axis) versus CD10 (y axis). Cytoqram **B**: CD19 (x-axis) against CD34 (y axis); a cluster of CD34⁺ B cells is clearly visualized (gate 3, green color) in an amount of 0.57% of myelocaryocytes.

Рисунок 4

Пример совпадения количества В-ЛП, оцененных на основании слабой экспрессии CD45 и экспрессии CD10; пре-пре-В-иммуноподвариант, CD34-, 15-й день

Figure 4

Example of coincidence of the number of BCPs evaluated based on weak expression of CD45 and expression of CD10; pre-pre-B immunosubvariant, CD34-negative, day 15



На цитограмме **А** в координатах CD19 (ось x) против CD45 (ось y) определяется гейт В-ЛП (gate 3, зеленый цвет) на основании отчетливой экспрессии CD19 в сочетании со слабой экспрессией CD45; количество CD19⁺CD45^{low} клеток – 35,1% от миелокариоцитов. Цитограмма **Б**: CD19 (ось x) против CD10 (ось y): те же клетки характеризуются яркой экспрессией CD10.

On the cytogram **A** in the coordinates CD19 (x axis) against CD45 (y axis), there is a gate of BCPs (gate 3, green) detected by a distinct expression of CD19 in combination with weak expression of CD45; number of CD19⁺ CD45^{low} cells – 35.1% of myelocaryocytes. Cytogram **B**: CD19 (x-axis) vs CD10 (y axis): the same cells are characterized by vivid expression of CD10.

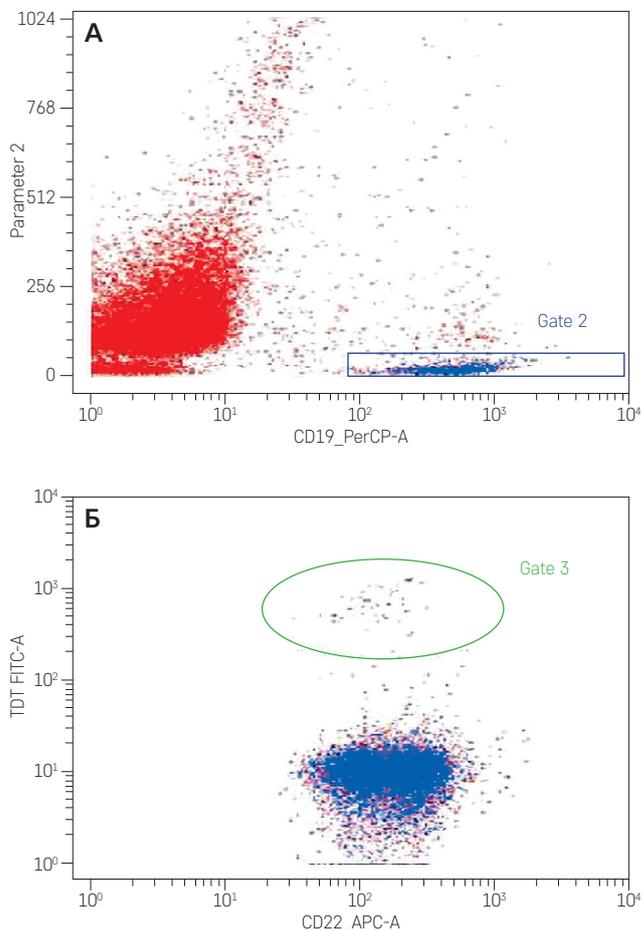
Иммунофенотип клеток МОВ на 15-й день терапии. Как показано группой госпиталя *St. Jude*, для оценки МОВ в середине терапии индукции ремиссии (15-й день) достаточно определить количество В-ЛП. Данный подход можно реализовать только на этом этапе лечения, так как к завершению индукции ремиссии (29–33-й дни) происходит регенерация КМ, и определение клеток МОВ возможно только с точки зрения ЛАИФ – при подсчете коли-

Рисунок 5

Выявление клеток МОВ на основании экспрессии TdT и cyCD22 в случае про-В-иммуноподварианта ОЛЛ

Figure 5

Detection of MRD cells based on the expression of nuTdT and cyCD22 in the case of pro-B immunosubvariant ALL



Пример оценки количества клеток МОВ на 15-й день на основании экспрессии ядерной TdT и цитоплазматического CD22 в случае про-В-иммуноподварианта ОЛЛ. Цитограмма **А**: gate ЯСК – подсчет В-клеток на основании экспрессии CD19 (ось x) против параметров бокового светорассеяния; CD19⁺-клетки составили 5,5% от миелокариоцитов. Цитограмме **Б**: gate 3 – 0,03% В-ЛП, выявленных на основании экспрессии ядерной TdT (ось y) против цитоплазматического CD22 (ось x).

An example of estimating the number of MRD cells on day 15 based on expression of nuclear TdT and cytoplasmic CD22 in the case of pro-B-immunosubvariant of ALL. Cytogram **A**: among the nucleated cells, the calculation of B-cells based on expression of CD19 (x axis) against side scattering parameters; D19⁺ cells accounted for 5.5% of myelocaryocytes. On cytogram **B**: gate 3 – 0.03% of BCPs detected based on the expression of nuclear TdT (y axis) versus cytoplasmic CD22 (x axis).

чества В-ЛП (CD19⁺CD10⁺/CD34⁺) с aberrантной экспрессией ряда антигенов. Наиболее часто используемый критерий aberrантности – гиперэкспрессия CD58 при слабой экспрессии CD38.

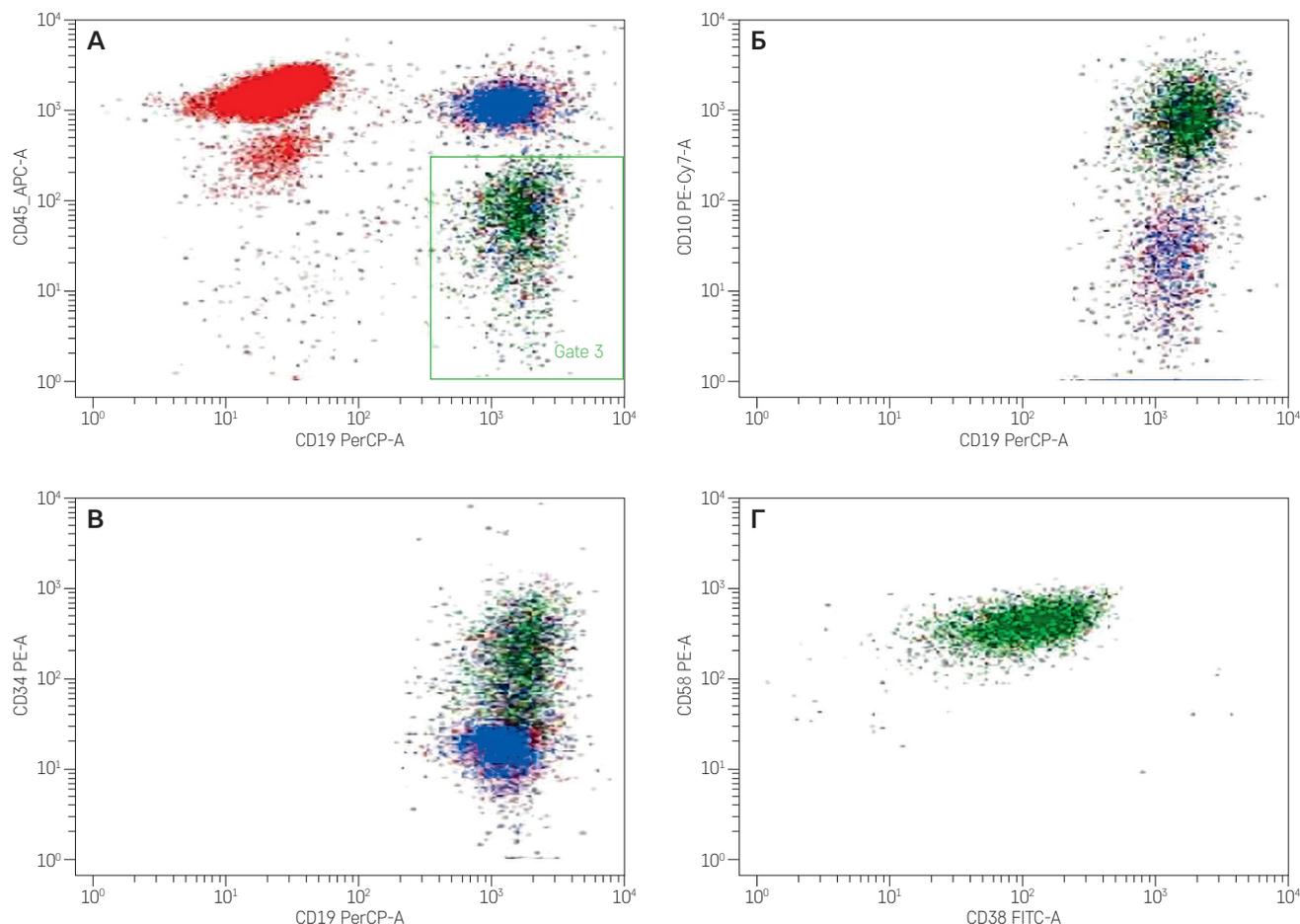
Сопоставление количества В-ЛП и В-лимфоцитов с aberrантной экспрессией антигенов CD58/CD38 в КМ на 15-й день индукционной химиотерапии представляется важным с точки зрения дальнейшей стандартизации ПЦ-протоколов оценки МОВ.

Рисунок 6

Оценка количества В-ЛП и особенности их иммунофенотипа на 15-й день индукционной химиотерапии

Figure 6

Estimation of the amount and immunophenotype features of BCPs on the 15th day of induction chemotherapy



На цитограмме **А** в координатах CD19 (ось x) против CD45 (ось y) определяется 16,6% CD19⁺CD45^{low} В-ЛП (gate 3, зеленый цвет). Клетки характеризуются яркой экспрессией CD10 (цитограмма **Б**, CD19 (ось x) против CD10 (ось y), а также отчетливой экспрессией CD34 (цитограмма **В**, CD19 (ось x) против CD34 (ось y). Клетки МОБ демонстрируют aberrantный иммунофенотип CD58⁺CD38^{low} (цитограмма **Г**, CD38 (ось x) против CD58 (ось y).

On the cytogram **A** in the coordinates CD19 (x axis) versus CD45 (y axis), 16.6% of CD19⁺ CD45^{low} BCPs are determined (gate 3, green). Cells are characterized by bright expression of CD10 (cytogram **B**, CD19 (x-axis) versus CD10 (y-axis), as well as a distinct expression of CD34 (cytogram **V**, CD19 (x-axis) versus CD34 (y-axis). MRD cells demonstrate the aberrant immunophenotype CD58⁺ CD38^{low} (cytogram **Г**, CD38 (x-axis) versus CD58 (y-axis).

Оценка экспрессии CD58/CD38 выполнена на 15-й день химиотерапии индукции у 28 больных. Только у 15 (54%) из них все В-ЛП, то есть клетки МОБ, имели aberrantный иммунофенотип CD58⁺/CD38^{low} (рисунок 6). В остальных случаях количество В-ЛП (CD19⁺CD10⁺/CD34⁺CD45^{low}) было больше, чем В-ЛП с иммунофенотипом CD58⁺/CD38^{low}.

Отдельно мы проанализировали количество CD58⁺/CD38^{low/-} В-ЛП в группе больных с отсутствием aberrantности по данному сочетанию антигенов при первичной диагностике (n = 11). Количество CD10⁺ В-клеток совпало с количеством CD58⁺/CD38^{low/-} В-ЛП только в 4 (36,4%) из 11 образцов. В остальных образцах aberrantных В-ЛП выявлено меньшее по сравнению с CD10⁺ В-клетками количество CD58⁺CD38^{low} В-ЛП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значение определения МОБ на 15-й день не вызывает сомнений. Именно уровень остаточных лейкозных бластов является инструментом возможной коррекции лечебных программ в процессе терапии. В случае В-ОЛЛ такая опция предусмотрена для группы больных, достигших МОБ-негативного статуса к середине терапии индукции ремиссии (15-й день). Для них возможно рассмотрение вопроса о снижении доз антрациклинов с учетом остальных факторов прогноза.

Несмотря на определенную клиническую ясность значения оценки МОБ на 15-й день, нерешенными остаются иммунологические аспекты. Так, каждая исследовательская группа создает свои ПЦ-панели

антител и алгоритмы оценки МОБ в рамках разработанных лечебных программ.

Сопоставив два основных подхода к оценке МОБ на 15-й день, мы сделали определенные выводы. С учетом уникальности иммунологической ситуации в КМ, складывающейся к середине индукционной терапии (15–19-й дни), упрощенный (трехцветный) ПЦ-протокол госпиталя *St. Jude* может быть использован только в данном временном интервале. Так, в конце терапии индукции ремиссии (29–33-й дни) начинается восстановление КМ, в связи с чем детекция МОБ возможна только на основании ЛАИФ, которые позволяют отличить нормальные регенерирующие В-ЛП от клеток остаточной опухоли.

При сопоставлении основных маркеров клеток-предшественников (CD10, CD34, CD45) на CD19⁺ В-клетках на 15-й день выявлены определенные закономерности, связанные как с первичным иммунофенотипом опухоли, так и с влиянием проводимого лечения на экспрессию АГ. Согласно данным литературы описано снижение экспрессии CD10 и CD34 в процессе химиотерапии [21, 22]. В нашем исследовании CD10 был наиболее надежным критерием оценки количества В-ЛП на 15-й день в случае пре-пре-В-иммуноподварианта ОЛЛ. Слабая экспрессия CD45 на CD19⁺ В-клетках может быть использована как дополнительный критерий для выявления В-ЛП. Экспрессия антигена CD34 наиболее сильно подвержена модуляциям в процессе химиотерапии; ее снижение описано в работах зарубежных авторов [21, 22]. Наши данные в целом сопоставимы с зарубежными, однако следует обратить внимание на то, что в нашем исследовании 21,6% случаев В-ОЛЛ были CD34-негативны при первичной диагностике; экспрессия данного антигена закономерно отсутствовала на клетках остаточной опухоли и на 15-й день.

Взаимосвязи клеток МОБ с первичным иммунофенотипом опухоли прослеживаются также в отношении ЛАИФ. В случае отсутствия аберрантности по АГ CD58/CD38 появление клеток с аберрантным иммунофенотипом CD58⁺⁺CD38^{low/-} на 15-й день, равное числу CD10⁺/CD34⁺ В-клеток, выявлено только в 36,4% случаев. Таким образом, подход, основанный на определении клеток МОБ на 15-й день как В-ЛП аберрантных по CD58/CD38, нецелесообразен, так

как может привести к занижению количества клеток МОБ. Однако нами набрана относительно небольшая группа оценки экспрессии АГ CD58/CD38 на 15-й день. Необходимо дальнейшее изучение особенностей иммунофенотипа клеток МОБ в отношении аберрантных АГ, а также изучение дополнительных критериев ЛАИФ В-лимфобластов.

Принципиально важным отличием двух сопоставленных нами протоколов был подход к анализу КМ. Так, протокол госпиталя *St. Jude* предусматривает анализ в МНК, а протокол группы BFM – в ЯСК. Важно, что включение в ПЦ-панель нуклеотропных красителей семейства *Syto* позволяет избежать возможного разбавления образца КМ дебрисом (разрушенными элементами), появляющимся под влиянием проводимой химиотерапии [18]. В нашем исследовании показано, что пересчет на МНК – более жесткий критерий детекции МОБ и, как следствие, клинической риск-стратификации.

ВЫВОДЫ

На основании опыта международных многоцентровых исследований не вызывает сомнений тот факт, что диагностика МОБ на 15-й день терапии В-ОЛЛ должна быть основана на выявлении В-ЛП. Оценка аберрантности В-ЛП по АГ CD58/CD38, как и альтернативных ЛАИФ, в середине индукции ремиссии носит в основном исследовательский характер и нуждается в дальнейшем изучении. А для рутинной практики, отвечающей основной клинической задаче – точной риск-стратификации больных, достаточно комбинации CD19/CD10/CD34/CD45 в сочетании с нуклеотропным красителем семейства *Syto* в случае CD10⁺ В-ОЛЛ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-09115.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Chernysheva O.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9630-5591>

Kupryshina N.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8509-0954>

Popa A.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5318-8033>

Tupitsin N.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Литература

- Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G., Dworzak M.N., Ratei R., VSilvestri D., et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukaemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009; 27 (31): 5168–74.
- Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23 (5): 1083–98.

3. Попов А.М., Белевцев М.В., Боякова Е.В., Вержицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Фадеева М.С. и соавт. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы Российско-Белорусской кооперативной группы. Онкогематология 2016; 11 (4): 64–73.
4. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G., Hancock M.L., Razzouk B.I., Ribeiro R.C., et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100 (1): 52–8.
5. Ratei R., Basso G., Dworzak M., Gaipa G., Veltroni M., Rhein P., et al. Monitoring treatment response of childhood precursors B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009; 23 (3): 528–34.
6. Gaynon P.S., Desai A.A., Bostrom B.C., Hutchinson R.J., Lange B.J., Nachman J.B., et al. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer* 1997; 80 (9): 1717–26.
7. Hitchcock-Bryan S., Gelber R.D., Cassidy J.R. The impact of induction anthracycline on long-term failure-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Medical and Pediatric Oncology* 1986; 14 (4): 211–5.
8. Meadows A.T., Robison L.L., Neglia J.P., Sather H., Hammond D., Pui C.P., et al. Potential long-term toxic effects in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *New English Journal of Medicine* 1989; 321 (26): 1830–1.
9. Ochs J.J. Neurotoxicity due to central nervous system therapy for childhood leukemia. *American Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1989; 11 (1): 93–105.
10. Packer R.J., Meadows A.T., Rorke L.B., Goldwein J.L., D'Angio G. Long-term sequelae of cancer treatment on the central nervous system in childhood. *Medical and Pediatric Oncology* 1987; 15 (5): 241–53.
11. Pui C.H., Behm F.G., Raimondi S.C., Dodge R.K., George S.L., Rivera G.K., et al. Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *New English Journal of Medicine* 1989; 321 (3): 136–42.
12. Rimm I.J., Li F.C., Tarbell N.J., Winston K.R., Sallan S.E. Brain tumors after cranial irradiation for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1987; 59 (8): 1506–8.
13. Schrappe M. M., Reiter A., Ludwig W.-D. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. *Blood* 2000; 95 (11): 331020.
14. Steinherz P.G., Gaynon P.S., Brenem J.M., Cherlow N.J., Grossman J.H., Kersey J.C., et al. Cyto-reduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia: the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996; 14 (2): 389–98.
15. Igarashi H., Medina K.L., Yokota T., Rossi M.I., Sakaguchi N., Comp P.C., et al. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids. *Int Immunology* 2005; 17 (5): 501–11.
16. Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Stow P. A simplified flow cytometry assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006; 108 (1): 97–102.
17. Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Серебрякова И.Н., Тупицын Н.Н. К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии. *Иммунология гемопоза* 2011; 1: 35–54.
18. Безнос О.А., Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Оптимизация проточно-цитометрических протоколов детекции минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах. *Медицинский алфавит* 2018; 1 (5) 342: 36–9.
19. Van Dongen J.J., van der Velden V.H., Bruggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125 (26): 3996–4009.
20. Безнос А., Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Шервашидзе М.А., Серебрякова И.Н., Баранова О.Ю. и соавт. Определение минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах с использованием подходов EuroFlow. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2017; 10 (2): 158–68.
21. Gaipa G., Basso G., Maglia O., Leoni V., Faini A., Cazzaniga G., et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005; 18: 703–8.
22. Gaipa G., Basso G., Aliprandi S., Migliavacca M., Vallinoto C., Maglia O., et al. Prednisone induces Immunophenotypic modulation of CD 10 and CD34 in non-apoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry Part B* 2008; 74B: 150–5.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 06.12.2019
Принята к печати 17.02.2020

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-68-78

Неинвазивное определение неблагоприятного гистологического варианта у детей с нейrogenными опухолями по накоплению ^{123}I -МИБГ с использованием полуколичественной и количественной оценок

Кайлаш, Е.Д. Киреева, И.С. Вдовина, М.Я. Ядгаров, Т.В. Шаманская, В.Ю. Рощин, Д.Ю. Качанов, Ю.Н. Ликарь

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

Контактная информация:
Ликарь Юрий Николаевич,
д-р мед. наук, заведующий
отделением ПЭТ и радионуклидной
диагностики НМИЦ детской гема-
тологии, онкологии и иммунологии
им. Дмитрия Рогачева Минздрава
России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: Yury.Likar@fccho-moscow.ru

Сцинтиграфия с ^{123}I -метайодобензилгуанидином (^{123}I -МИБГ) широко используется для диагностики и стадирования у пациентов с нейrogenными опухолями. Лечение пациентов с нейробластомой (НБ) зависит от группы риска и базируется на многих клинических и генетических факторах, включая гистологический вариант опухоли. Цель исследования: неинвазивное определение неблагоприятного гистологического варианта по интенсивности накопления ^{123}I -МИБГ в нейrogenной опухоли. Данное исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В ретроспективное исследование включили 96 пациентов с впервые выявленной нейrogenной опухолью. На этапе инициальной диагностики всем пациентам выполнили сцинтиграфию с ^{123}I -МИБГ с протоколом ОФЭКТ/КТ. Полуколичественный (TLCRR) и количественный (SUV_{max}) методы оценки были использованы для получения количественных значений интенсивности накопления ^{123}I -МИБГ в первичной опухоли. Среди 96 МИБГ-позитивных пациентов 54 были с НБ, 28 – с ганглионейробластомой (ГНБ) и 14 – с ганглионейромой (ГН). Средние значения TLCRR и SUV_{max} при НБ составили 5,67 и 7,5; при ГНБ – 2,58 и 3,1; при ГН – 1,48 и 1,85 соответственно. Центильный анализ показал, с какой вероятностью значение каждого параметра для конкретного типа опухоли не превысит рассчитанное. Использование протокола ОФЭКТ/КТ и современного программного обеспечения позволяют выполнять полуколичественную и количественную оценки интенсивности накопления ^{123}I -МИБГ в опухоли, а полученные значения TLCRR и SUV_{max} как отдельно, так и в комбинации с нейронспецифической энolahзой могут быть использованы для неинвазивного определения неблагоприятного гистологического варианта.

Ключевые слова: нейробластома, ганглионейробластома, ганглионейрома, сцинтиграфия, метайодобензилгуанидин (^{123}I -МИБГ), SUV_{max} , TLCRR

Кайлаш и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 68–78.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-68-78

Non-invasive prediction of an unfavorable histological variant in patients with neuroblastic tumors using the quantitative and semiquantitative assessment of ^{123}I -MIBG uptake

Kailash, E.D. Kireeva, I.S. Vdovina, M.Ya. Yadgarov, T.V. Shamanskaya, V.Yu. Roshin, D.Yu. Kachanov, Yu.N. Likar

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

Correspondence:
Yury N. Likar, MD., PhD, Head
of Nuclear Medicine Department
of 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: Yury.Likar@fccho-moscow.ru

^{123}I -metaiodobenzylguanidine (^{123}I -MIBG) scintigraphy is widely used for the detection and staging of neuroblastoma. Risk-adapted treatment in patients with neuroblastic tumors is based on many clinical and genetic factors including histopathology. Purpose: non-invasive prediction of an unfavorable histological variant in patients with neuroblastic tumors using quantitative assessment of ^{123}I -MIBG uptake. This study was approved by the Independent Ethical Committee and the Academic Council of Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. 96 patients were included in this retrospective study. ^{123}I -MIBG-scintigraphy including whole body planar images and SPECT/CT were performed for all patients before any type of treatment. Semiquantitative and quantitative assessment of ^{123}I -MIBG uptake were calculated and analyzed. Out of 96 patients: 54 with neuroblastoma (NB), 28 with ganglioneuroblastoma (GNB) and 14 with ganglioneuroma (GN). The average values of TLCRR and SUV_{max} for NB were 5.67 and 7.5, for GNB – 2.58 and 3.1 and for GN – 1.48 and 1.85, respectively. A centile analysis was carried out for all groups. SPECT/CT in combination with modern software allows semiquantitative and quantitative assessment of ^{123}I -MIBG uptake in neuroblastic tumor. The TLCRR and SUV_{max} can be used separately as well as in combination with NSE for prediction of histological variant.

Key words: neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma, scintigraphy, metaiodobenzylguanidine (^{123}I -MIBG), SUV_{max} , TLCRR

Kailash, et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 68–78.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-68-78

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 06.12.2019
Accepted 17.02.2020

Нейробластома (НБ) – самая частая экстракраниальная солидная опухоль в детском возрасте, которая развивается из клеток-предшественников симпатической нервной системы и относится к группе нейрогенных опухолей. Существует несколько гистологических типов нейрогенных опухолей – НБ, ганглионейробластома (ГНБ), ганглионейрома (ГН), которые первоначально происходят из клеток нервного гребня и представлены нейробластами, ганглиозными и стромальными клетками в различном соотношении [1, 2], при этом ГН рассматривается как доброкачественное образование. Несмотря на то что доля НБ составляет 8–10% всех злокачественных новообразований (ЗНО) у детей, данная патология ответственна за 12–15% смертей от ЗНО в детском возрасте [3].

Риск прогрессии и смертности от заболевания у пациентов с НБ критически зависит от следующих прогностических факторов: возраста пациента, клинической стадии, гистологического варианта и молекулярно-генетических характеристик (наличия хромосомных aberrаций). Эти факторы были включены в международную систему стратификации на группы риска *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) [4]. Стратификация пациентов на группы риска согласно INRG имеет огромное значение для выбора тактики лечения. Для примера, пациентам с недифференцированной НБ и наличием генетических aberrаций показано более агрессивное лечение, чем пациентам с ГН [5]. Стратификацию опухоли на группы риска обычно проводят на основании гистологического исследования образцов опухолевой ткани, полученных в результате биопсии или хирургического удаления опухоли.

Гистологический тип опухоли определяется согласно критериям Международной гистологической классификации НБ *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC–*Shimada system*), в соответствии которой выделяют следующие типы по степени клеточной дифференцировки: НБ (недифференцированный подтип, низкодифференцированный подтип, дифференцирующийся подтип); смешанная ГНБ и нодулярная ГНБ; доброкачественная ГН [1, 2]. Следует отметить, что для корректного определения некоторых прогностических факторов (клинической стадии) огромную роль играют методы визуализации: магнитно-резонансная томография (МРТ), компьютерная томография (КТ), сцинтиграфия с метайодобензилгуанидином, меченым ^{123}I (^{123}I -МЙБГ), с дополнительным использованием протокола однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, совмещенной с компьютерной томографией (ОФЭКТ/КТ), а также некоторые лабораторные тесты, включающие определение специфических маркеров в сыворотке крови и морфологическое исследование

костного мозга. Безусловно, только комплексная оценка всех прогностических факторов риска позволяет принять правильное решение о тактике ведения пациента с НБ.

В настоящей работе мы сконцентрировали свое внимание на возможности неинвазивного определения гистологического варианта по интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ в первичном образовании у детей с НБ, используя количественные методы оценки. Идея неинвазивного определения гистологического варианта НБ в зависимости от интенсивности накопления МЙБГ не нова. Еще в 1999 году в своей работе *С. Окуята и соавт.*, используя визуальную оценку интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ у пациентов с НБ, пытались установить взаимосвязь между интенсивностью накопления и неблагоприятным гистологическим вариантом [6]. Развитие технологий и создание гибридного оборудования, включая ОФЭКТ/КТ, дало возможность применять полуколичественные методы оценки интенсивности накопления, результаты которых с большей точностью могут предсказать неблагоприятный гистологический вариант [7, 8]. Сегодня появилась возможность выполнять количественную оценку интенсивности накопления, используя значения стандартизованного накопления (*Standardized Uptake Values – SUV*) при ОФЭКТ/КТ [9, 10].

Цель работы: оценка возможности неинвазивного определения неблагоприятного гистологического варианта по интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ, измеренной при помощи полуколичественного и количественного методов, а также их сочетанного использования совместно с результатами таких лабораторных показателей, как нейронспецифическая энолаза (НСЭ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ферритин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В ретроспективное исследование включены 96 пациентов – 46 мальчиков и 50 девочек; медиана возраста – 2 года (от 0 до 17 лет), с впервые выявленной нейрогенной опухолью, которым на этапе инициальной диагностики выполнили сцинтиграфию с ^{123}I -МЙБГ с протоколом ОФЭКТ/КТ области первичного образования и печени. Всем пациентам исследования выполняли на базе НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Критерии включения: первичные пациенты; наличие гистологического подтверждения диагноза «нейрогенная опухоль» (НБ, ГНБ, ГН); наличие накоп-

ления в первичной опухоли при скintiграфии с ^{123}I -МЙБГ; наличие протокола ОФЭКТ/КТ (первичного образования и области печени) при проведении скintiграфии с ^{123}I -МЙБГ; доступность результатов исследований для анализа в системе хранения данных визуализации (*Picture Archiving and Communication System – PACS*).

Протокол скintiграфии с ^{123}I -МЙБГ. Скintiграфию с ^{123}I -МЙБГ выполняли на двухдетекторной гамма-камере *Discovery 670* ОФЭКТ/КТ (*GE Healthcare, США*) с использованием стандартных протоколов. Всем пациентам выполняли исследование в режиме «все тело» в передней и задней проекциях и головы в боковых проекциях. После получения планарных изображений врач-радиолог определял область интереса (включающую первичное образование и область печени) для выполнения протокола ОФЭКТ/КТ. Скintiграфию с ^{123}I -МЙБГ выполняли через 24 ч после внутривенного введения радиофармпрепарата через центральный или периферический катетер в дозе 5 МБк/кг, при этом минимальная доза составила 40 МБк, а максимальная не превышала 370 МБк. Для получения планарных изображений в режиме «все тело» использовали следующие параметры сбора данных: детекторы в положении «*anterior and posterior*» с коллиматорами для низких энергий с высоким разрешением; энергетический пик изотопа – 159 keV; ширина энергетического окна – 20%; скорость движения стола – 5 см/мин. Протокол ОФЭКТ: угол вращения детекторов – 3°; время сбора – 30 сек. на матрицу – 128 × 128. Для получения совмещенных ОФЭКТ/КТ-изображений выполняли протокол низко-

дозовой КТ с учетом массы тела пациента. Реконструкцию и анализ полученных планарных и ОФЭКТ/КТ-совмещенных изображений при скintiграфии с ^{123}I -МЙБГ выполняли на рабочей станции *Xeleris* (*GE Healthcare, США*) и *HERMES Medical Imaging suite* (*Hermes Medical Solutions, Стокгольм, Швеция*).

Полуколичественный метод оценки интенсивности накопления (*tumor-to-liver count-rate ratio – TLCRR*). Для получения значений интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ при помощи полуколичественного метода определяли отношение максимальной активности в объеме 1 см³ опухолевой ткани к среднему значению накопления в объеме 1 см³ непораженного участка паренхимы правой доли печени (*рисунок 1*).

$$\text{TLCRR} = \frac{\text{Максимальная активность в объеме 1 см}^3}{\text{Средняя активность в 1 см}^3 \text{ печени}}$$

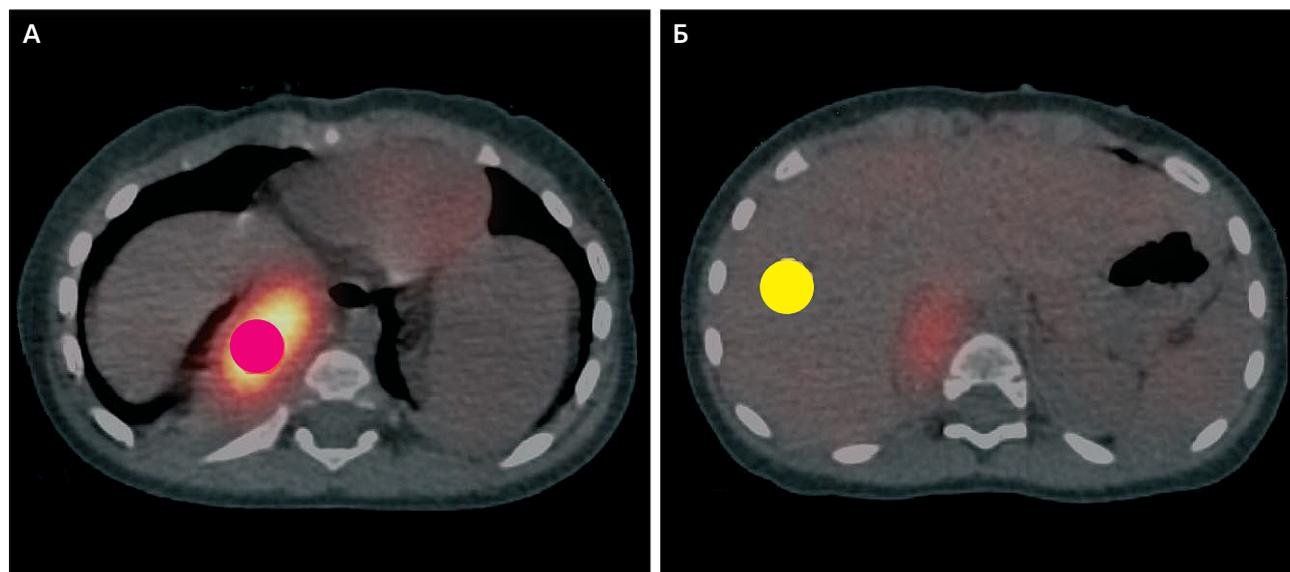
Для определения максимальной активности в 1 см³ опухолевой ткани при просмотре срезов визуально определяли участок накопления с наибольшей интенсивностью в опухоли, затем проводили измерения импульсов в указанном объеме. Чаще измерения выполняли на нескольких срезах и в разных проекциях (аксиальной, коронарной и сагиттальной) и выбирали максимальное значение. Для получения средних значений накопления в печени проводили измерения импульсов в 1 см³ правой доли печени на нескольких срезах и в разных проекциях. Далее полученные значения суммировали и делили на количество измерений. В случаях множественного

Рисунок 1

Определение интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ на ОФЭКТ/КТ-совмещенных изображениях с помощью полуколичественного метода TLCRR: А – измерение максимальной активности в объеме 1 см³ опухоли; Б – измерение средней активности в объеме 1 см³ печени

Figure 1

Semiquantitative assessment of MIBG uptake (TLCRR) in NB patient on SPECT/CT images: A – measurement of the maximum activity of a tumor in a volume of 1 cm³; Б – measurement of average activity of liver in a volume of 1 cm³



метастатического поражения правой доли печени измерения выполняли в непораженном участке паренхимы, а при отсутствии такого – в левой доле.

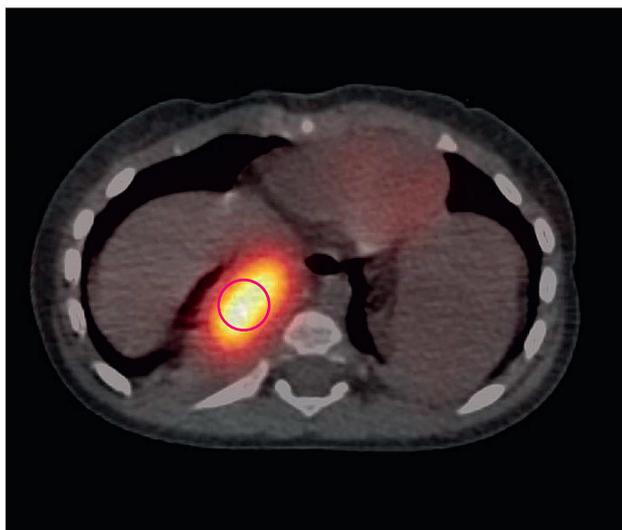
Количественный метод оценки интенсивности накопления. Для получения количественного значения интенсивности накопления использовали значения стандартизованного накопления (SUV) и выбирали максимальное накопление в опухоли (SUV_{max}). Отметим, что для выполнения количественной оценки интенсивности накопления с помощью SUV требовалось произвести несколько технических действий: 1) выполнить необходимую калибровку двухдетекторной гамма-камеры *Discovery 670* ОФЭКТ/КТ (*GE Healthcare*, США) с использованием фантома, содержащего изотоп, и КТ-фантома; 2) интегрировать полученные значения в программное обеспечение *HERMES Medical Imaging suite* (*Hermes Medical Solutions*, Стокгольм, Швеция); 3) непосредственно перед анализом введенную активность ^{123}I -МЙБГ и время введения для каждого пациента вносили в протокол программного обеспечения *HERMES Medical Imaging* и выполняли реконструкцию полученных изображений. На реконструированных изображениях проводили оценку максимального накопления в опухолевой ткани с помощью SUV на программном обеспечении *HERMES Medical Imaging suite* (рисунки 2).

Рисунок 2

Определение интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ на ОФЭКТ/КТ-совмещенных изображениях в опухоли с помощью количественного метода SUV_{max}

Figure 2

Quantitative assessment of MIBG uptake (SUV_{max}) in NB patient on SPECT/CT images



Лабораторные тесты: НСЭ, ЛДГ, ферритин.

Всем пациентам на этапе диагностики проводили лабораторные тесты по определению НСЭ, ЛДГ, ферритина; их результаты были доступны в медицинской информационной системе.

Подготовка пациента к исследованию. Перед выполнением сцинтиграфии с ^{123}I -МЙБГ проводится стандартная подготовка: блокада щитовидной железы препаратами йода и отмена определенных лекарственных препаратов (подробнее правила подготовки представлены на сайте Европейского общества ядерной медицины (<https://www.eanm.org/>)). Все пациенты, которым выполняли исследование с использованием анестезиологического пособия, дополнительно соблюдали рекомендации врача-анестезиолога, включая голод за 4–6 ч до начала исследования.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием свободной среды разработки *RStudio*. Проверку гипотезы о соответствии распределения выборки нормальному закону проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Непараметрический U-критерий Манна–Уитни применяли для проверки гипотезы H_0 об одинаковой генеральной совокупности двух выборок. Для множественных сравнений использовали поправку Бонферрони для контроля групповой вероятности ошибки (ошибки первого рода или ошибочного отвержения основной гипотезы H_0). Критерий Краскела–Уоллиса использовали для проверки равенства медиан нескольких групп; ROC-анализ – для отражения соотношения между чувствительностью и специфичностью параметров при варьировании порога решающего правила.

Количественная интерпретация проведена по показателю AUC-площади, ограниченной ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций:

- 0,7 > AUC ≥ 0,6 (и 0,3 < AUC ≤ 0,4) – незначительная информативность;
- 0,8 > AUC ≥ 0,7 (и 0,2 < AUC ≤ 0,3) – средняя информативность;
- 0,9 > AUC ≥ 0,8 (и 0,1 < AUC ≤ 0,2) – высокая информативность;
- AUC ≥ 0,9 (и AUC ≤ 0,1) – выдающаяся информативность.

Произведен центильный анализ (расчет центилей для каждого параметра).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью полуколичественного (TLCRR – *tumor to liver count-rate ratio*) и количественного (SUV) методов были получены значения интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ в первичном образовании для каждого пациента, включенного в исследование. Дополнительно для возможности сочетанного использования и определения значимости каждого параметра отдельно использовали результаты лабораторных тестов (НСЭ, ЛДГ и ферритин) для каждого пациента. Полученные средние значения изучаемых параметров представлены в *таблице 1*.

Таблица 1

Полученные средние значения параметров SUV_{max}, TLCRR, НСЭ, ЛДГ и ферритина

Table 1

The average values of SUV_{max}, TLCRR, NSE, LDH and Ferritin

Параметр (среднее значение и разброс) Parameter (mean value and variation)	Гистологический вариант Histological variants		
	НБ (n = 54)	ГНБ (n = 28)	ГН (n = 14)
TLCRR	5,67 (1,07–17,1)	2,58 (0,28–6,7)	1,48 (0,45–4,8)
SUV _{max}	7,5 (3,2–22,68)	2,58 (0,49–10,5)	1,48 (0,51–5,6)
НСЭ NSE	85,07 (9–370)	2,58 (5,8–91,6)	1,48 (0,8–41)
ЛДГ LDH	469,8 (241–2865)	334,97 (132–2303)	251,14 (132–624)
Ферритин Ferritin	148,6 (10–466)	107,36 (9–943)	45,93 (9–162)

Примечание: НБ – нейробластома; ГНБ – ганглионейробластома; ГН – ганглионейрома; TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio; SUV_{max} – maximum standardized uptake value; НСЭ – нейрон-специфическая энтолаза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

Notes: NB – neuroblastoma, GNB – ganglioneuroblastoma, GN – ganglioneuroma, TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio, SUV_{max} – maximum standardized uptake value, NSE – neuron specific enolase, LDH – lactate dehydrogenase.

Таблица 3

Попарное множественное сравнение выборок по параметрам SUV_{max}, TLCRR и НСЭ с помощью критерия Манна–Уитни

Table 3

Mann–Whitney test: multiple comparison of SUV_{max}, TLCRR and NSE

Группа Multiple Comparison	Параметр Parameter		
	SUV _{max}	TLCRR	НСЭ NSE
НБ и ГНБ NB and GNB	H ₁ p = 0,000	H ₁ p = 0,000	H ₁ p = 0,001
ГН и ГНБ GN and GNB	H ₁ p = 0,016	H ₁ p = 0,009	H ₀ p = 0,128
НБ и ГН NB and GN	H ₁ p = 0,000	H ₁ p = 0,000	H ₁ p = 0,003

Примечание: НБ – нейробластома; ГНБ – ганглионейробластома; ГН – ганглионейрома; TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio; SUV_{max} – maximum standardized uptake value; НСЭ – нейрон-специфическая энтолаза.

Notes: NB – neuroblastoma, GNB – ganglioneuroblastoma, GN – ganglioneuroma, TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio, SUV_{max} – maximum standardized uptake value, NSE – neuron specific enolase.

Таблица 2

Расчет критерия Краскела–Уоллеса для множественного сравнения по параметрам SUV_{max}, TLCRR, НСЭ, ЛДГ и ферритина

Table 2

The Kruskal–Wallis test for multiple comparisons for SUV_{max}, TLCRR, NSE, LDH and Ferritin

Параметр Parameter	SUV _{max}	TLCRR	НСЭ NSE	ЛДГ LDH	Ферритин Ferritin
Уровень значимости и принятая гипотеза p-value	H ₁ p = 0,000	H ₁ p = 0,000	H ₁ p = 0,000	H ₀ p = 0,379	H ₀ p = 0,178

Примечание: SUV_{max} – maximum standardized uptake value; TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio; НСЭ – нейрон-специфическая энтолаза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

Notes: TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio, SUV_{max} – maximum standardized uptake value, NSE – neuron specific enolase, LDH – lactate dehydrogenase.

По результатам гистологического исследования из 96 МИБГ-позитивных пациентов выделили три группы: пациенты с НБ (n = 54), ГНБ (n = 28) и высоко дифференцированной ГН (n = 14).

Расчет критерия Шапиро–Уилка показал несоответствие распределения данных нормальному закону, поэтому в дальнейшем были использованы критерии непараметрической статистики.

Произведен множественный анализ для выявления различий между тремя группами пациентов в значениях параметров SUV_{max}, TLCRR, НСЭ, ЛДГ и ферритина (таблица 2). Статистически значимые различия определили в значениях параметров SUV_{max}, TLCRR и НСЭ. Для значений параметров ЛДГ и ферритина статистически значимых различий не выявлено, а значит, использование этих параметров для проведения дифференциальной диагностики опухолевого типа нецелесообразно.

Для попарного сравнения выборок по параметрам использован расчет U-статистики Манна–Уитни (таблица 3). Гипотезу H₁ принимали в том случае, если уровень значимости p ≤ 0,017 (с учетом поправки Бонферрони). Выявлены статистически значимые различия между всеми группами по всем параметрам, за исключением параметра НСЭ для групп ГН и ГНБ. Таким образом, целесообразно применение всех трех параметров: SUV_{max}, TLCRR и НСЭ.

Проведен анализ чувствительности и специфичности выбранных параметров в дифференциальной диагностике опухолевого типа; ROC-кривые для выбранных параметров для каждого опухолевого типа представлены на рисунке 3.

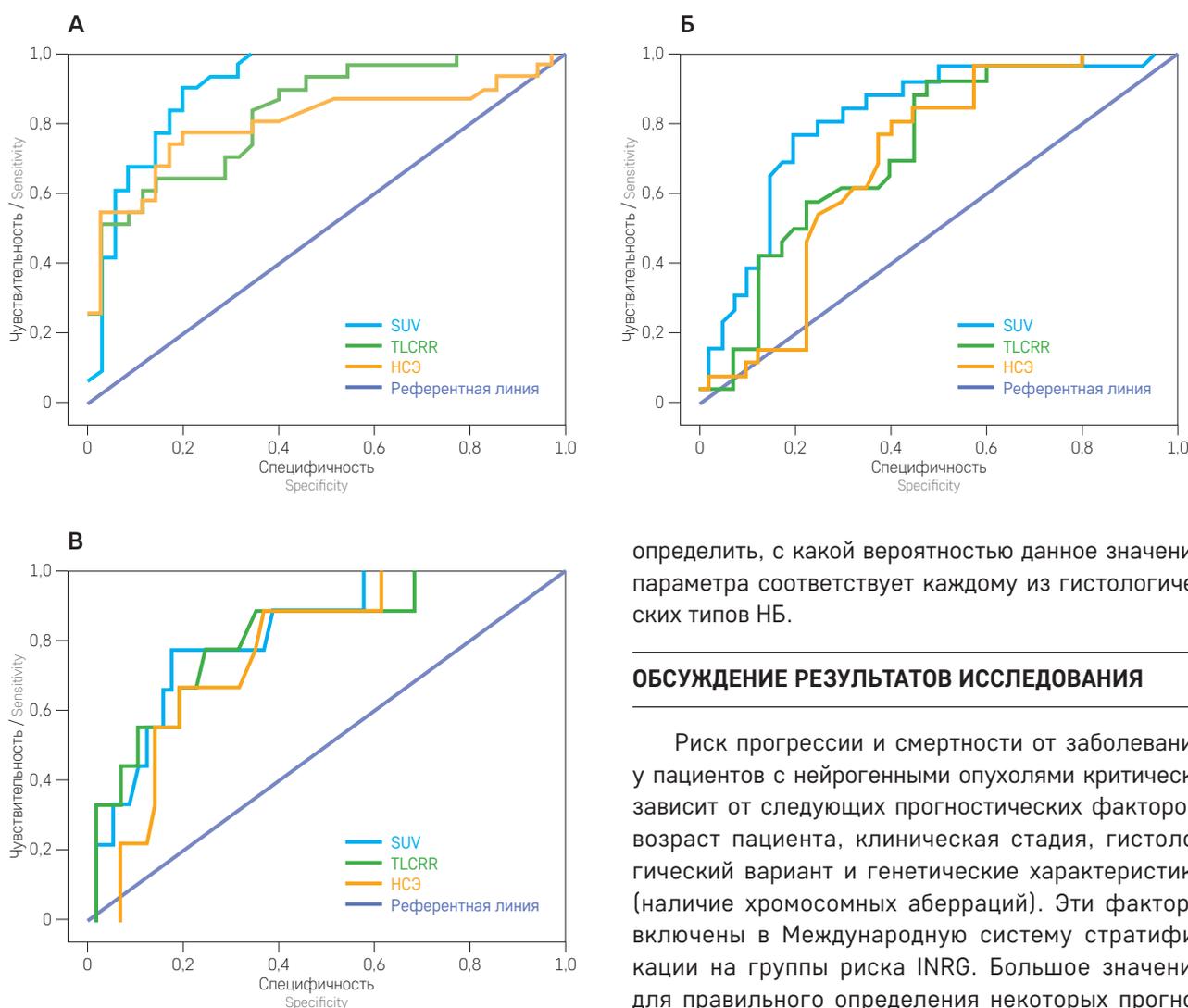
С целью оценки информативности исследуемых параметров произведен анализ параметра AUC (площадь под ROC-кривой), результаты представлены в таблице 4. Для случаев НБ и ГН значение AUC

Рисунок 3

ROC-кривые для параметров SUV_{max} , TLCRR и HCЭ для трех вариантов нейробластомы: **А** – недифференцированная нейробластома; **Б** – ганглионейробластома; **В** – ганглионейрома

Figure 3

ROC curves for SUV_{max} , TLCRR and NSE for three histopathological variants of neuroblastic tumors: **A** – undifferentiated neuroblastoma; **Б** – ganglioneuroblastoma; **В** – ganglioneuroma



$SUV_{max} > 0,9$, то есть этот параметр обладает выдающейся информативностью. Для случая ГНБ AUC $SUV_{max} > 0,8$ – в данном случае параметр обладает высокой информативностью. Параметры TLCRR и HCЭ обладают высокой информативностью для случаев НБ и ГН и средней информативностью – для случая ГНБ.

Центильный анализ. Рассчитаны центили с шагом в 5% для параметров SUV_{max} , TLCRR и HCЭ. Полученные результаты приведены в *таблице 5*. Центильный анализ показал, с какой вероятностью значение каждого из параметров для конкретного типа опухоли не превысит рассчитанное. Для удобства были использованы коридоры 25–75%, а также 5–25% и 75–95%. Таким образом, на основании сопоставления рассчитанных значений параметров SUV_{max} , TLCRR и HCЭ с табличными данными можно

определить, с какой вероятностью данное значение параметра соответствует каждому из гистологических типов НБ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Риск прогрессии и смертности от заболевания у пациентов с нейрогенными опухолями критически зависит от следующих прогностических факторов: возраст пациента, клиническая стадия, гистологический вариант и генетические характеристики (наличие хромосомных aberrаций). Эти факторы включены в Международную систему стратификации на группы риска INRG. Большое значение для правильного определения некоторых прогностических факторов, а именно клинической стадии, имеет скинтиграфия с ^{123}I -МЙБГ и/или ^{131}I -МЙБГ. Данный метод диагностики достаточно хорошо изучен и показал свою значимость у детей с НБ для диагностики и стадирования, оценки ответа на терапию, селекции пациентов для проведения радиотерапии с ^{131}I -МЙБГ [11–14]. Один из недостатков скинтиграфии с ^{123}I -МЙБГ (в основном это касается планарных изображений в режиме «все тело») – отсутствие возможности количественной оценки (включая интенсивность накопления). Потребность в количественной оценке существует всегда и имеет определенное значение для клинической практики. Например, предложенные методы оценки распространенности процесса при скинтиграфии с ^{123}I -МЙБГ – *Curie score* или *SIOPEN score* (визуальное определение количества очагов в сегментах тела пациента с НБ на планарных скинтиграммах, результат которого

Таблица 4

Значения параметра AUC и границы доверительного интервала для трех гистологических вариантов нейробластомы

Table 4

Results of ROC curve analysis. Corresponding AUC-ROC, *p*-value and 95% CI are given for different parameter

Параметр Parameter	Гистологический тип Histological variants	AUC	Стандартная ошибка Standard deviation	<i>p</i> -value	95% доверительный интервал 95% CI	
					нижняя граница lower limit	верхняя граница upper limit
SUV _{max}	НБ NB	0,923	0,047	0,000	0,830	1,000
НСЭ NSE		0,858	0,059	0,000	0,743	0,973
TLCRR		0,895	0,046	0,000	0,804	0,986
SUV _{max}	ГН GN	0,926	0,048	0,006	0,822	1,000
НСЭ NSE		0,924	0,055	0,005	0,817	1,000
TLCRR		0,898	0,060	0,009	0,780	1,000
SUV _{max}	ГНБ GNB	0,826	0,063	0,000	0,702	0,950
НСЭ NSE		0,762	0,072	0,002	0,621	0,903
TLCRR		0,735	0,075	0,006	0,587	0,883

Примечание: НБ – нейробластома; ГНБ – ганглионейробластома; ГН – ганглионейрома; TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio; SUV_{max} – maximum standardized uptake value; НСЭ – нейрон-специфическая энтолаза; AUC – area under curve.

Notes: NB – neuroblastoma, GNB – ganglioneuroblastoma, GN – ganglioneuroma, TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio, SUV_{max} – maximum standardized uptake value, NSE – neuron specific enolase, AUC – area under ROC curve, CI – confidence interval.

Таблица 5

Результаты центильного анализа

Table 5

The results of centile analysis

Центили, % Centiles, %	НБ NB			ГНБ GNB			ГН GN		
	SUV _{max}	TLCRR	НСЭ NSE	SUV _{max}	TLCRR	НСЭ NSE	SUV _{max}	TLCRR	НСЭ NSE
5	3,73	2,45	14,71	0,91	0,93	12,00	0,60	0,50	13,00
10	4,53	2,85	19,20	1,28	1,03	16,00	5,60	4,80	34,00
15	4,95	3,08	23,10	1,46	1,10	18,50	0,67	0,62	14,96
20	5,12	3,34	24,80	1,62	1,22	19,30	0,72	0,74	16,48
25	5,34	4,02	27,50	1,80	1,28	20,23	0,77	0,83	18,00
30	5,70	4,39	29,20	1,96	1,31	21,30	0,81	0,87	18,02
35	6,06	4,51	30,09	2,15	1,39	21,85	1,03	0,88	18,05
40	6,30	4,66	32,75	2,45	1,95	22,00	1,28	0,92	18,17
45	6,49	4,94	34,41	2,61	2,14	22,75	1,52	1,03	18,38
50	6,80	5,08	42,00	2,83	2,38	23,00	1,64	1,09	18,60
55	7,45	5,14	52,80	2,94	2,74	24,50	1,72	1,15	19,56
60	7,97	5,46	66,40	3,11	3,12	26,00	1,82	1,30	20,52
65	8,20	5,70	77,37	3,19	3,34	28,00	2,01	1,37	21,80
70	8,71	6,24	79,60	3,29	3,50	28,30	2,20	1,46	23,40
75	9,20	6,95	93,60	3,78	3,54	28,68	2,22	1,84	25,00
80	9,60	8,68	111,76	4,51	3,59	29,20	2,25	2,03	25,40
85	10,20	9,30	122,80	5,16	3,79	32,75	2,35	2,14	25,80
90	10,57	9,68	206,40	5,38	4,35	38,25	3,41	2,59	27,60
95	12,06	12,71	299,50	5,79	4,92	40,38	4,50	3,50	30,80

Примечание: НБ – нейробластома; ГНБ – ганглионейробластома; ГН – ганглионейрома; TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio; SUV_{max} – maximum standardized uptake value; НСЭ – нейрон-специфическая энтолаза.

Notes: NB – neuroblastoma, GNB – ganglioneuroblastoma, GN – ganglioneuroma, TLCRR – tumor-to-liver count-rate ratio, SUV_{max} – maximum standardized uptake value, NSE – neuron specific enolase.

выражается в баллах) – позволяют получить полуколичественную оценку распространенности процесса при стадировании и, что особенно важно, при оценке ответа на терапию [15]. Использование этих методов оценки позволяет дополнительно выделить пациентов с неблагоприятным прогнозом из группы высокого риска как на этапе инициальной диагностики, так и на этапе окончания терапии индукции [16].

Количественная оценка интенсивности накопления радиофармпрепарата в опухоли позволяет использовать результаты сцинтиграфии с ^{123}I -МЙБГ в неинвазивном определении еще одного прогностического фактора – гистологического варианта опухоли. Определить взаимосвязь между неблагоприятным гистологическим вариантом опухоли и значениями интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ в опухоли, полученными при использовании методов полуколичественной и количественной оценок, их сочетанном применении, а также совместно с результатами лабораторных тестов и стало основной целью нашей работы.

Идея неинвазивного определения гистологического варианта НБ в зависимости от интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ не нова. *С. Окуяма* и соавт. для определения взаимосвязи между интенсивностью накопления ^{123}I -МЙБГ и гистологическим вариантом НБ проводили визуальную оценку интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ в опухоли при анализе планарных изображений 23 пациентов с НБ. Авторы показали, что интенсивность накопления ^{123}I -МЙБГ была выше в недифференцированных или слабо дифференцированных образованиях по сравнению с дифференцированной опухолью [6]. В еще одном опубликованном исследовании *В. Brans* и соавт. на примере 26 пациентов с НБ определяли интенсивность накопления ^{123}I -МЙБГ на планарных сцинтиграммах, используя 7-балльную визуальную шкалу. Однако авторы не получили какой-либо взаимосвязи между интенсивностью накопления ^{123}I -МЙБГ и дифференцировкой опухоли [17]. К сожалению, только визуальная оценка интенсивности накопления имеет ряд недостатков и требует количественного подтверждения. Трудности, связанные с интерпретацией интенсивности накопления при ее визуальной оценке, были показаны на примере позитронно-эмиссионной томографии [18].

Использование протокола ОФЭКТ/КТ и современного программного обеспечения позволяет применять полуколичественные и количественные методики для оценки интенсивности накопления, что имеет большое значение и большие перспективы [13]. В последнее время из-за спроса на получение изображений после радионуклидной терапии протокол ОФЭКТ/КТ перешел от относительных и полуколичественных способов оценки к количе-

ственному определению, а именно – к нормализованному поглощению с использованием значения стандартизованного накопления (SUV) [9]. Поэтому в работах 2013 и 2015 годов *W.P. Fendler* и соавт. вместо 7-балльной визуальной оценки предложили использовать полуколичественный метод оценки интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ (TLCRR), в основе которого определение отношения накопления в 3 см^3 самого яркого очага в опухоли к накоплению в 3 см^3 непораженного участка паренхимы правой доли печени [7]. Авторы показали на примере 55 педиатрических пациентов с нейрогенными опухолями, что интенсивное накопление ^{123}I -МЙБГ было выше при НБ, чем при ГН или ГНБ, и накопление высокой интенсивности определялось при НБ с высокой митотической активностью [7]. Дополнительно показано, что полуколичественный метод TLCRR имеет высокую специфичность и высокий результат AUC-ROC (0,86), но достаточно низкую чувствительность из-за высокой частоты ложнонегативных находок при определении неблагоприятного гистологического варианта. В работе 2015 года авторы показали, что комбинированное использование двух тестов (TLCRR + значения НСЭ) увеличивает точность прогноза по определению неблагоприятного гистологического варианта. Использование предложенного алгоритма уменьшило количество ложнонегативных результатов приблизительно наполовину. Таким образом, применение комбинированного анализа позволило значительно улучшить показатели чувствительности, аккуратности и относительного риска в определении неблагоприятного гистологического варианта по сравнению с использованием значений каждого параметра отдельно [8].

В нашей работе для неинвазивного определения неблагоприятного гистологического варианта НБ по интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ мы сравнили два метода оценки интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ: метод полуколичественной оценки – TLCRR, предложенный ранее [7], и метод количественной оценки – SUV, который впервые использовался в нашей работе. Дополнительно, помимо полуколичественной и количественной оценок интенсивности накопления, был выполнен комбинированный анализ с включением результатов НСЭ, ЛДГ и ферритина для каждого пациента из групп НБ, ГНБ и ГН (*таблица 1*). Выявлены статистически значимые различия между всеми группами (НБ, ГНБ и ГН) в определяемых параметрах (TLCRR, SUV_{max} и НСЭ) (*таблицы 2, 3*); для ЛДГ и ферритина статистически значимых различий не выявлено, поэтому использование этих параметров для определения гистологического варианта опухоли признано нецелесообразным.

Как показано в нашем исследовании, используемые параметры TLCRR и SUV_{max} обладают высокой

и выдающейся информативностью для НБ и ГН, а в случаях с ГНБ – средней и высокой информативностью соответственно (таблица 4, рисунок 3). На наш взгляд, применение SUV_{max} предпочтительнее, чем TLCRR, так как оценка максимального накопления выполняется только в опухолевой ткани и не зависит от накопления в печени, что особенно важно для пациентов с метастатическим поражением печени. К тому же количественный метод SUV более прост в исполнении, однако необходима предварительная калибровка оборудования и специальное программное обеспечение.

У двух пациентов с ГН были получены значения интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ, определенные с помощью TLCRR (4,8 и 3,3) и SUV_{max} (5,6 и 3,9), выше средних результатов для данной группы пациентов. Так, интенсивность накопления, оцениваемая с помощью параметров TLCRR и SUV, в большинстве случаев ГН не превышала 2,1 и 2,8 соответственно. При гистологическом исследовании и в первом, и во втором случае резидуальная ткань надпочечника прослеживалась по периферии опухоли, а при микроскопическом исследовании были обнаружены в том числе и клетки мозгового слоя (рисунок 4). При анализе изображений у некоторых пациентов мы наблюдали физиологическое накопление МЙБГ в неизмененных надпочечниках с достаточно высокой интенсивностью ($SUV_{max} = 3,9$) (рисунок 5). В качестве объяснения, пусть и спекулятивного, можно предположить, что завышенные значения интенсивности накопления у двух пациентов с ГН были обусловлены не только и не столько накоплением в

самой опухоли, сколько физиологическим накоплением в клетках надпочечника (рисунок 5). Тем не менее ввиду небольшого объема выборки пациентов с ГН данные значения нельзя считать статистическим выбросом. Впоследствии при увеличении объема выборки пациентов с ГН следует ожидать уменьшения межквартильного размаха параметров и, как следствие, исключения таких экстремальных значений и признание их статистическими выбросами.

Возможность прогнозирования гистологического варианта нейрогенных опухолей может иметь важное клиническое значение. В частности, у пациентов с факторами риска по визуализации (*Image-Defined Risk Factors – IDRF*), которые определяют полноту резекции опухоли и риск развития хирургических осложнений [19], указание на наличие НБ может склонить лечащих врачей в сторону выполнения на первом этапе биопсии опухоли с последующим проведением неoadъювантой терапии. Напротив, полученные с помощью описанного выше метода данные о наличии более дифференцированной нейрогенной опухоли (ГНБ и ГН) могут стать важными аргументами в пользу выполнения резекции опухоли на первом этапе. Кроме этого, необходимо подчеркнуть, что нейрогенные опухоли часто характеризуются гетерогенностью гистологической структуры, то есть возможностью существования в одной опухоли более или менее дифференцированных участков (например, сочетание ГНБ и ГН). Биопсия опухоли, особенно выполненная из одного участка, не всегда может предоставить полноценную информацию обо всей структуре опухоли, при этом использование

Рисунок 4

Гистологический препарат ткани опухоли (ганглионейрома) и надпочечника (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$):

А – резидуальная ткань надпочечника по периферии;

Б – опухолевая ткань

Figure 4

Histological examination of a removed tumor sample (ganglioneuroma) stained with hematoxylin and eosin shows the residual adrenal tissue on the periphery (A) and tumor tissue in the center (B)

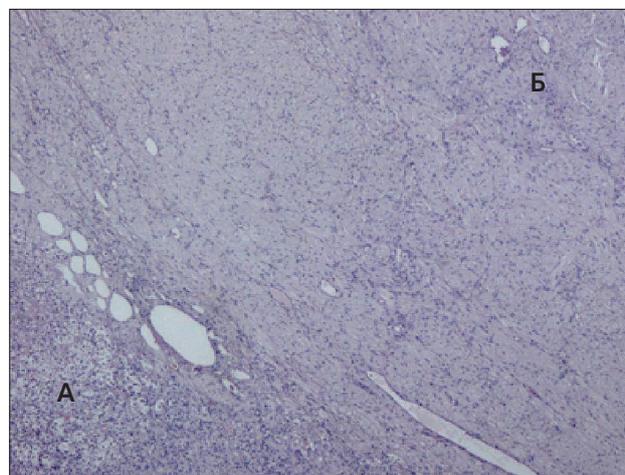
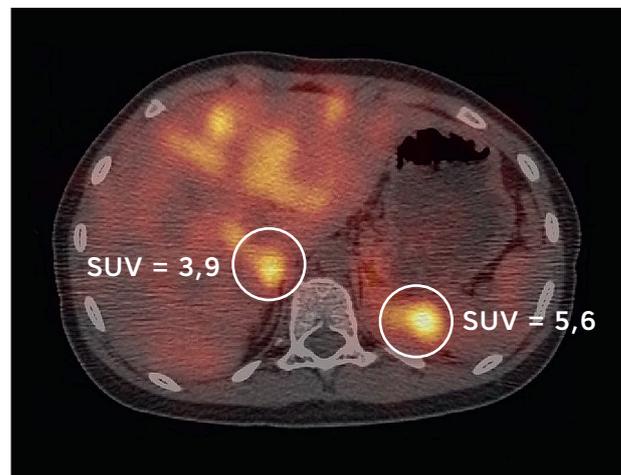


Рисунок 5

Определение интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ на ОФЭКТ/КТ-совмещенных изображениях с помощью количественного метода SUV_{max} : представлены количественные значения накопления в опухоли левого надпочечника (ганглионейрома) и в неизмененном правом надпочечнике

Figure 5

Quantitative values (SUV_{max}) of MIBG uptake in ganglioneuroma (left adrenal gland) as well as in the normal right adrenal gland are demonstrated on SPECT/CT image



неинвазивных методик, основанных на оценке интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ, позволит получить дополнительные данные о наличии в опухоли низкодифференцированных компонентов.

Важно подчеркнуть, что методика, представленная в настоящей статье и разработанная на репрезентативной когорте первичных больных с нейрогенными опухолями, требует изучения у пациентов с МЙБГ-позитивной остаточной опухолью на момент завершения специального лечения для оценки степени дифференцировки опухоли (сохранение недифференцированной НБ, созревание во вторичную ГНБ и ГН). Данный метод будет полезен также в группе пациентов с локальной прогрессией остаточного компонента опухоли, особенно у тех больных, которым проводили полихимиотерапию, так как в этом случае возможны индуцированное «дозревание» незрелой злокачественной НБ в доброкачественную ГН и увеличение размеров образования за счет стромального компонента [20]. Это поможет при принятии решения о выполнении только биопсии, радикальной операции или продолжении динамического наблюдения.

ВЫВОДЫ

Использование протокола ОФЭКТ/КТ и современного программного обеспечения позволяет выполнять полуколичественную и количественную оценки интенсивности накопления ^{123}I -МЙБГ в опухоли, а полученные значения интенсивности накопления как отдельно, так и в комбинации с результатами лабораторных тестов могут быть использованы для определения неблагоприятного гистологического

варианта. По результатам статистического анализа показана целесообразность использования параметров SUV_{max} , TLCRR и НСЭ для формирования дифференциального заключения о гистологическом типе опухоли. Использование с этой целью параметров ЛДГ и ферритина признано нецелесообразным. Результатом центильного анализа стало формирование таблицы вероятности, в которой значение каждого параметра не превысит рассчитанное для данного гистологического типа опухоли, что может быть использовано для разработки программного обеспечения, позволяющего сформировать дифференциальное заключение о гистологическом типе опухоли. Методика неинвазивного прогнозирования гистологического варианта совместно с другими клиническими и визуализационными данными (КТ, МРТ) при нейрогенных опухолях у детей может иметь большое клиническое значение для выбора тактики ведения (биопсия, расширенная операция, полихимиотерапия).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Kailash ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7427-4560>

Kireeva E.D. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3990-8879>

Vdovina I.S. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9176-2347>

Yadgarov M.Ya. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3792-1682>

Shamanskaya T.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3767-4477>

Roshin V.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9375-7517>

Kachanov D.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3704-8783>

Likar Yu.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6158-2222>

Литература

- Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J., Joshi V.V., Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999; 86 (2): 349–63.
- Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J., Joshi V.V., Roald B., et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999; 86 (2): 364–72.
- Louis C.U., Shohet J.M. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* 2015; 66: 49–63.
- Monclair T., Brodeur G.M., Ambros P.F., Brisse H.J., Cecchetto G., Holmes K., et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009; 27 (2): 298–303.
- Matthay K.K., Perez C., Seeger R.C., Brodeur G.M., Shimada H., Atkinson J.B., et al. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 1998; 16 (4): 1256–64.
- Okuyama C., Ushijima Y., Watanabe K., Sugihara H., Nishimura T. Iodine-123-MIBG scintigraphy in neuroblastoma; relationship between the intensity of uptake and tumor characteristics. *Kaku Igaku* 1999; 36 (8): 827–34.
- Fendler W.P., Melzer H.I., Walz C., von Schweinitz D., Copenrath E., Pfluger T. High ^{123}I -MIBG uptake in neuroblastic tumours indicates unfavourable histopathology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40 (11): 1701–10.
- Fendler W.P., Wenter V., Thornton H.I., Ilhan H., von Schweinitz D., Copenrath E. Combined Scintigraphy and Tumor Marker Analysis Predicts Unfavorable Histopathology of Neuroblastic Tumors with High Accuracy. *PLoS One* 2015; 10 (7): e0132809.
- Bailey D.L., Willows K.P. An evidence-based review of quantitative SPECT imaging and potential clinical applica-

- tions. *J Nucl Med* 2013; 54 (1): 83–9.
10. McDougald W.A., Miyaoka R.S., Alessio A.M., Harrison R.L., Lewellen T.K. A study of SPECT/CT camera stability for quantitative imaging. *EJNMMI Phys* 2016; 3: 14.
 11. Jacobson A.F., Deng H., Lombard J., Lessig H.J., Black R.R. ¹²³I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the detection of neuroblastoma and pheochromocytoma: results of a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95 (6): 2596–606.
 12. Sharp S.E., Gelfand M.J., Shulkin B.L. Pediatrics: diagnosis of neuroblastoma. *Semin Nucl Med* 2011; 41 (5): 345–53.
 13. Sharp S.E., Trout A.T., Weiss B.D., Gelfand M.J. MIBG in Neuroblastoma Diagnostic Imaging and Therapy. *Radiographics* 2016; 36 (1): 258–78.
 14. Vik T.A., Pfluger T., Kadota R., Castel V., Tulchinsky M., Farto J.C., et al. ¹²³I-MIBG scintigraphy in patients with known or suspected neuroblastoma: Results from a prospective multicenter trial. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52 (7): 784–90.
 15. Matthay K.K., Shulkin B., Ladenstein R., Michon J., Giammarile F., Lewington V. Criteria for evaluation of disease extent by ¹²³I-metaiodobenzylguanidine scans in neuroblastoma: a report for the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Task Force. *Br J Cancer* 2010; 102 (9): 1319–26.
 16. Decarolis B., Schneider C., Hero B., Simon T., Volland R., Roels F., et al. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy scoring allows prediction of outcome in patients with stage 4 neuroblastoma: results of the Cologne interscore comparison study. *J Clin Oncol* 2013; 31 (7): 944–51.
 17. Brans B., Laureys G., Schelfhout V., Wiele C.V., Potter C.R., Dhooge C. Activity of iodine-123 metaiodobenzylguanidine in childhood neuroblastoma: lack of relation to tumour differentiation in vivo. *Eur J Nucl Med* 1998; 25 (2): 144–9.
 18. Kluge R., Chavdarova L., Hoffmann M., Kobe C., Malkowski B., Montravers F., et al. Inter-Reader Reliability of Early FDG-PET/CT Response Assessment Using the Deauville Scale after 2 Cycles of Intensive Chemotherapy (OEPA) in Hodgkin's Lymphoma. *PLoS One* 2016; 11 (3): e0149072.
 19. Cecchetto G., Mosseri V., De Bernardi B., Helardot P., Monclair T., Costa E. Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J Clin Oncol* 2005; 23 (33): 8483–9.
 20. Качанов Д.Ю., Шаманская Т.В., Коновалов Д.М., Ликарь Ю.Н., Рощин В.Ю., Муфтахова Г.М. и соавт. Ганглионейрома у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2014; 13 (3): 33–41.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-79-84

Поражение кожи при лимфоме Беркитта: редкое клиническое наблюдение

Т.Т. Валиев, Н.В. Матинян, Е.Г. Громова, М.А. Шервашидзе, Н.Н. Тупицын, Е.В. Захарова, Е.В. Михайлова, П.А. Керимов, К.И. Киргизов, С.Р. Варфоломеева

Научно-исследовательский институт детской онкологии и гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Лимфома Беркитта – один из наиболее изученных и курбельных вариантов лимфом у детей. Но, несмотря на глубокое изучение лимфомогенеза на иммунологическом и молекулярно-генетическом уровнях, диагностика некоторых клинических проявлений заболевания может оказаться непростой задачей даже для опытного клинициста. В статье представлено редкое описание поражения кожи у ребенка 4 лет. Представлены клинико-морфоиммунологическая характеристика кожных поражений и ответ на программное лечение. Родители дали согласие на использование информации, в том числе фото ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: лимфома Беркитта, кожа, диагностика, лечение, дети

Валиев Т.Т. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 79–84.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-79-84

Skin involvement in Burkitt lymphoma: rare clinical case

T.T. Valiev, N.V. Matinyan, E.G. Gromova, M.A. Shervashidze, N.N. Tupitsyn, E.V. Zakharova, E.V. Mikhailova, P.A. Kerimov, K.I. Kirgizov, S.R. Varfolomeeva

Pediatric Oncology and Hematology Research Institute of N.N. Blokhin National Research Cancer Center of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

Burkitt lymphoma (BL) is one of the most studied and curable type of lymphoma in children. But in spite of lymphomagenesis deep understanding on immunologic, molecular and genetic levels, diagnosis of some rare clinical presentations of disease become challenging task for well-qualified clinicians. In the current issue we present rare case of skin involvement in pediatric 4 year old patient with disseminated BL. It is presented clinical and morphologic characteristic of specific skin presentation. Used multiagent chemotherapy with rituximab deliver the result of complete response. Skin site regression was found on 2d day of treatment. Parents give their agreement to use personal data, including fotos, in research and publications.

Key words: Burkitt lymphoma, skin, diagnosis, children

Valiev T.T., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 79–84.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-79-84

© 2020 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 25.11.2019
Принята к печати 23.12.2019

Контактная информация:
Валиев Тимур Теймуразович,
д-р мед. наук, ст. научный сотрудник
отделения химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.
Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
E-mail: timurvaliev@mail.ru

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»
Received 25.11.2019
Accepted 23.12.2019

Correspondence:
Timur T. Valiev, MD, PhD, senior research scientist, Department of Hemoblastoses Chemotherapy, Pediatric Oncology and Hematology Research Institute of N.N. Blokhin National Research Cancer Center of Ministry of Health of Russian. Address: Russia, 115478, Moscow, Kashirskoe sh., 24
E-mail: timurvaliev@mail.ru

Лимфома Беркитта (ЛБ) – один из самых частых вариантов В-клеточных лимфом у детей. В 2018 году исполнилось 60 лет с момента первого описания *Денисом Беркиттом* опухоли лицевого скелета у детей аборигенов Уганды [1]. С тех пор детально изучены клинические, морфологические, иммунологические и цитогенетические характеристики ЛБ, разработаны высокоэффективные программы терапии, позволяющие даже при поздних (III–IV) стадиях этого заболевания достигать многолетней выживаемости у 89,1–95,6% пациентов [2, 3].

В соответствии с современными классификациями ЛБ представлена тремя вариантами – эндемичным, спорадическим и ассоциированным с иммунодефицитом [4]. При спорадическом варианте (характерно для России) часто происходит поражение лимфатических узлов брюшной полости (40,9–48,2% случаев), печени, почек (22,9–27,7%) и костного мозга (24,1%). Опухолевый асцит и плеврит

отмечены у 25,3 и 24,1% больных соответственно. Реже (10–20% случаев) диагностируют вовлечение в опухолевый процесс периферических лимфатических узлов, миндалин, тонкой кишки, костей черепа, большого сальника. Крайне редко (5–10% случаев) в ходе диссеминации опухолевого процесса происходит поражение центральной нервной системы, поджелудочной железы, желудка, органов репродуктивной системы [5].

Большую клиническую проблему составляют казуистические локализации ЛБ, составляющие менее 5% всех опухолевых локализаций, – селезенка, легкие, тимус, внутригрудные лимфатические узлы. Как единичные клинические случаи в мировой литературе описаны поражения кожи при ЛБ. Имеются данные о том, что поражение кожи у пациентов с ЛБ возможно при ВИЧ-инфекции [6, 7], равно как и при отсутствии иммунодефицита [8]. Вовлечение в опухолевый процесс кожи происходит при диссеминации ЛБ [8]. Патогномоничных для ЛБ элементов на коже

нет. Среди описанных случаев кожные элементы были представлены как одиночными узловыми образованиями, так и диссеминированными элементами сыпи [9], а значит, описание каждого нового случая поражения кожи при ЛБ расширяет современные представления о клинических проявлениях ЛБ, актуально и важно с клинико-диагностических позиций.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Родители дали согласие на использование информации, в том числе фото ребенка, в научных исследованиях и публикациях. Больной С., 4 года, заболел 24–26 июля 2019 года: на коже спины появились элементы сыпи. В течение суток отмечено распространение сыпи на коже конечностей, передней брюшной стенки. Ребенок был осмотрен педиатром: заподозрен дерматит; рекомендована терапия преднизолоном. На фоне приема преднизолона 27–28 июля 2019 года появились жалобы на вздутие и увеличение размеров живота. С 29–30 июля 2019 года состояние ухудшилось: нарастала слабость, снизился аппетит, появились боли в животе. По месту жительства выполнены магнитная резонансная томография (МРТ) и рентгеновская компьютерная томография (РКТ) органов брюшной полости, по результатам которых выявлено увели-

Рисунок 1

Внешний вид поражений кожи при лимфоме Беркитта (фото представлено с согласия родителей пациента)

Figure 1

The outward appearance of skin involvement in patient with Burkitt lymphoma (photo provided with parental consent)



чение лимфатических узлов брюшной полости. С подозрением на лимфому ребенок был направлен в НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина Минздрава России (далее – НИИ ДОГ) для дообследования и определения лечебной тактики.

При поступлении больного в отделение химиотерапии гемобластозов НИИ ДОГ (05.08.2019) состояние оценено как тяжелое, обусловленное лимфопролиферативным, интоксикационным синдромами, кахексией. Кожные покровы бледные, умеренно влажные; на туловище и конечностях – элементы пятнисто-папулезной сыпи с тенденцией к слиянию, выражен кожный зуд (рисунки 1). Периферические лимфатические узлы при осмотре и пальпации не увеличены. Аускультативно в легких дыхание жесткое, хорошо проводится во все отделы, хрипов нет; ЧД – 22 в мин. Гемодинамика стабильная; АД – 100/70 мм рт. ст.; пульс – 98 уд./мин. Живот увеличен в размерах за счет опухоли. При пальпации в центральных и боковых отделах живота определялось опухолевое образование, плотное, ограниченно подвижное. Печень при пальпации и перкуссии – +2,5 см из-под края реберной дуги; селезенка – +1 см. Стула не было в течение 2 суток. Мочеиспускание регулярное, безболезненное. Диурез в достаточном объеме.

Рисунок 2

РКТ органов брюшной полости с внутривенным контрастированием: общий вид опухолевого конгломерата, занимающего всю полость живота

Figure 2

Contrast-enhanced computed tomography of abdomen: general view of tumor, spread to abdominal cavity



При обследовании (05.08.2019) в общем анализе крови лейкоциты составляли $11,17 \times 10^9/\text{л}$; тромбоциты – $473 \times 10^9/\text{л}$; гемоглобин – 100 г/л. Лейкоцитарная формула не изменена. В биохимическом анализе крови: глюкоза – 3,3 ммоль/л; мочевины – 6,7 ммоль/л; креатинин – 56 мкмоль/л; мочевая кислота – 801 ммоль/л; билирубин общий – 3,7 мкмоль/л; АЛТ – 15,5 Е/л; АСТ – 139 Ед/л; ЛДГ – 7163 Ед/л; калий – 4,89 ммоль/л; фосфор – 0,9 ммоль/л.

При проведении РКТ органов грудной клетки и брюшной полости (06.08.2019) установлено, что вся полость живота выполнена конгломератом, представ-

Рисунок 3

РКТ органов брюшной полости с внутривенным контрастированием: большие стрелки – узлы в брюшной полости и на брыжейке тонкой кишки; малая стрелка – узлы на брюшине

Figure 3
Contrast-enhanced computed tomography of abdomen:
large arrow – tumor lesions on mesostenium,
small arrow – tumor lesions on abdominal membrane

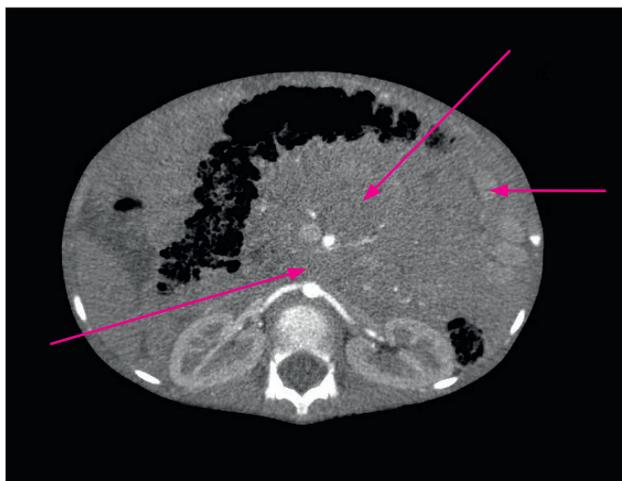


Рисунок 4

РКТ органов брюшной полости с внутривенным контрастированием: большая стрелка – лимфатические узлы в области селезеночной части сальниковой сумки; малая стрелка – лимфатические узлы в воротах печени

Figure 4
Contrast-enhanced computed tomography of abdomen: large arrow – lymphatic nodes in the area of peritoneal omental sac (splenic part), small arrow – lymphatic nodes in porta hepatis



ленным измененными петлями тонкой кишки, утолщенными большим и малым сальниками, узловыми образованиями на брюшине, брыжейках тонкой и сигмовидной кишок, увеличенными лимфатическими узлами брюшной полости, в том числе в области ворот печени и селезенки. Диаметр отдельных опухолевых узлов достигал 4 см. Конгломерат распространялся в забрюшинное пространство с вовлечением лимфатических узлов. Протяженность конгломерата составляла 30 см. Стенка толстой кишки не изменена. Конгломерат увеличенных лимфатических узлов сдавливал почечные артерии, смещал мочевой пузырь вправо и вниз, почки и селезенку кзади, поджелудочную железу – кзади и влево. Печень, поджелудочная железа, правая и левая почки, селезенка – без очаговых изменений; чашечно-лоханочная система не расширена. Концентрационная и выделительная функции почек не снижены. В полости живота межпетельно и свободно выявлялось небольшое количество жидкости (рисунки 2–4).

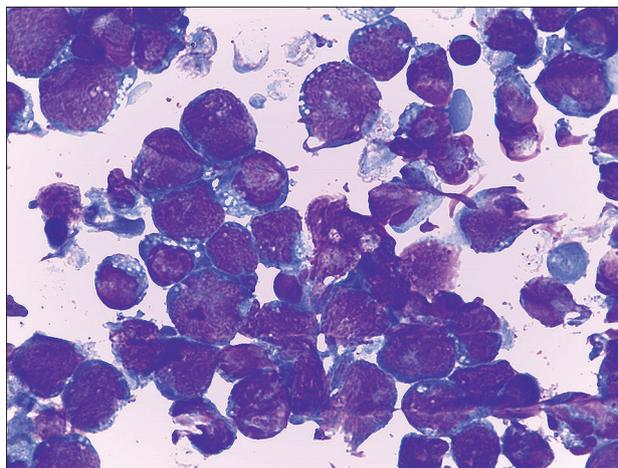
На фоне обогащенного и деформированного легочного рисунка очаговые и инфильтративные изменения в легких по данным РКТ не выявлены. Внутригрудные лимфатические узлы не увеличены. Жидкость и газ в плевральных полостях не определялись. В области переднего реберно-диафрагмального синуса, справа на плевре, выявлялись единичные узлы до 1,0 см в диаметре.

По данным миелограммы признаков поражения костного мозга не было. При цитологическом исследовании спинномозговой жидкости опухолевые клетки не обнаружены.

Рисунок 5

Цитологическая картина асцитической жидкости: цитологический состав соответствует лимфоме Беркитта (окраска по Романовскому–Гимзе, ув. $\times 1000$)

Figure 5
Cytological picture of ascitic fluid: cytogram of Burkitt lymphoma (staining: Romanowsky–Giemsa, enlargement $\times 1000$)



Проведена лапароскопическая биопсия опухоли (07.08.2019). Интраоперационно выполнен забор асцитической жидкости для цитологического исследования, по результатам которого найдены бластные клетки с выраженной базофилией и вакуолизацией цитоплазмы (рисунок 5). При цитологическом исследовании биоптата опухолевого конгломерата брюшной полости определялись клетки эпителия, макрофаги, клетки мезотелия, единичные укрупненные сохранные клетки – как разрозненно лежащие, так и в виде единичных скоплений с нежной структурой хроматина, выраженной базофилией и вакуолизацией цитоплазмы (рисунок 6).

В связи с неясным генезом кожных элементов сыпи проведена биопсия кожи, мазки-отпечатки биоптата направили на цитологическое исследование, которое позволило определить скопления крупных бластных клеток с нежной структурой хроматина, округлыми ядрами, выраженной базофилией и вакуолизацией цитоплазмы. Цитологический материал соответствовал лимфоме Беркитта (рисунок 7).

По результатам гистологического исследования биоптата кожи и опухолевого образования брюшной полости картина оказалась идентичной и была представлена диффузной пролиферацией лимфоидных клеток средних размеров, с бластной структурой хроматина. Привлекало внимание обилие митозов и макрофагов, фагоцитирующих апоптотические тельца. Гистологическая картина соответствовала классическому варианту ЛБ.

Иммунофенотипирование на криостатных срезах опухолевой ткани выявило экспрессию опухолевыми

клетками HLA-DR, CD45, CD10, CD19, CD20, CD38, IgM. Маркер Ki-67 составлял более 95%. Опухолевые клетки не экспрессировали TdT, CD34, CD3, CD5, CD7. При цитогенетическом исследовании на парафиновых блоках методом FISH выявлена транслокация t(8;14)(q24;q32). Перестройки с вовлечением генов *BCL2/BCL6* не обнаружены.

В операционной перед проведением биопсии были взяты анализы крови. В общем анализе крови эритроциты составляли $3,33 \times 10^{12}/л$; тромбоциты – $512 \times 10^9/л$; лейкоциты – $13,5 \times 10^9/л$; гемоглобин – 94 г/л. Исследование кислотно-щелочного состояния (КЩС) и газов крови: pH – 7,39; pCO₂ – 31 mmHg; pO₂ – 32 mmHg; натрий – 137 ммоль/л; калий – 3,7 ммоль/л; глюкоза – 3,2 ммоль/л; лактат – 7,6 ммоль/л. Биохимический анализ крови: АЛТ – 24,15 Ед/л; АСТ – 247,78 Ед/л; креатинин – 56,84 мкмоль/л; общий билирубин – 10,11 мкмоль/л; общий белок – 71,54 г/л.

Анестезию проводили интубационным наркозом. Перед интубацией внутривенно вводили: дексаметазон – 4 мг (продолжает и потенцирует действие анальгетиков, обладает антиэметическим свойством); раствор фентанила 0,005% – 1,0 мл; с целью облегчения ларингоскопии назначили миорелаксант – раствор круарона, 10 мг. На мониторе, по данным ЭКГ, регистрировался синусовый ритм с ЧСС – 125 уд./мин.

Через 45 мин от начала операции: АД – 95/76 мм рт. ст.; ЧСС – 120 уд./мин; SpO₂ – 99%. В анализе КЩС по данным лабораторного мониторинга: pH = 7,22; pCO₂ – 53 mmHg; pO₂ – 45 mmHg;

Рисунок 6

Цитологическое исследование мазков-отпечатков биоптата опухоли брюшной полости: цитологический состав соответствует лимфоме Беркитта (окраска по Романовскому-Гимзе, ув. $\times 1000$)

Figure 6

Cytological picture of abdominal tumor: cytogram of Burkitt lymphoma (staining: Romanowsky-Giemsa, enlargement $\times 1000$)

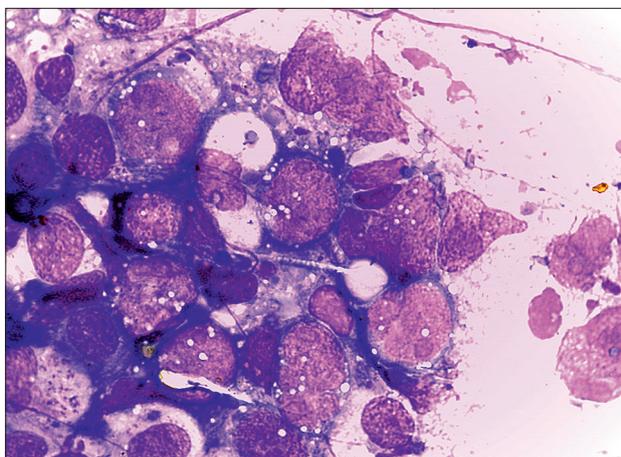
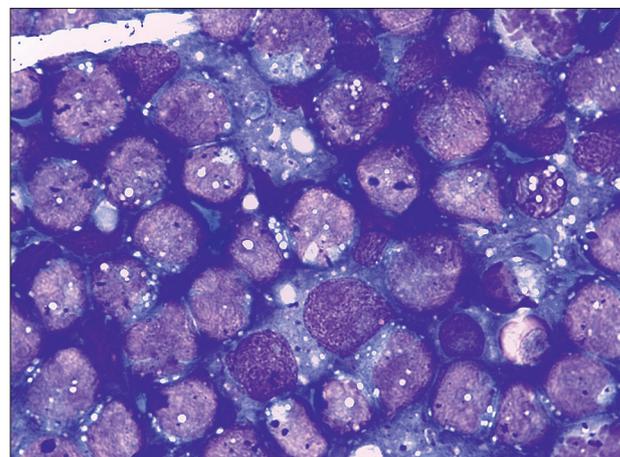


Рисунок 7

Цитологическое исследование мазков-отпечатков биоптата кожи: цитологический состав соответствует лимфоме Беркитта (окраска по Романовскому-Гимзе, ув. $\times 1000$)

Figure 7

Cytological picture of skin: cytogram of Burkitt lymphoma (staining: Romanowsky-Giemsa, enlargement $\times 1000$)



натрий – 126 ммоль/л; калий – 6,6 ммоль/л; кальций – 0,91 ммоль/л; глюкоза – 2,9 ммоль/л; лактат – 11,4 ммоль/л. Учитывая резкий рост калия, заподозрен синдром острого лизиса опухоли.

Начата инфузионная терапия, внутривенно: NaCl – 0,9%; фуросемид – 0,5 мл; раствор кальция глюконата 10% – 5,0 мл; раствор глюкозы 40% – 10,0 мл. После завершения операции, по данным ЭКГ-мониторинга, – фибрилляция желудочков. Выполнена дефибрилляция – J30, J50, J100 последовательно. Назначены: лидокаин – 40 мг + 40 мг, внутривенно, дробно; амиодарон – 100 мг + 100 мг, внутривенно, капельно, дробно; раствор кальция глюконата 10% – 5,0 + 5,0, внутривенно; раствор глюкозы 40% – 10,0 + 10,0, внутривенно. Поддержка гемодинамики растворами норэпинефрина и эпинефрина. Через 30 мин на фоне интенсивной терапии по данным электрокардиомонитора: узловой ритм с ЧСС 78–88 уд./мин; АД – 80/40 мм рт. ст.; SpO₂ – 100%. По данным биохимического анализа крови: нарастание гиперкалиемии (до 9 ммоль/л) и лактат-ацидоза (уровень лактата > 15 ммоль/л; pH = 6,8; дефицит оснований = -24).

Учитывая прогрессивное увеличение уровня калия (6,5 ммоль/л через 45 мин от начала операции;

9,0 ммоль/л через 120 мин) и лактата (11,4 ммоль/л через 45 мин от начала операции; > 15 ммоль/л через 120 мин), выраженный метаболический ацидоз (pH 6,86), было принято решение об экстренном проведении гемодиализа с целью снижения уровня калия, предположительно, поступающего из распадающейся опухоли.

Через 40 мин после начала гемодиализа отмечены первые эпизоды синусового ритма, еще через 40 мин – снижение калия до 6,6 ммоль/л и лактата до 9,2 ммоль/л. Полное восстановление синусового ритма, стабилизация гемодинамики (АД – 100/55 мм рт. ст., ЧСС – 100 уд./мин) отмечено через 2 ч от начала процедуры гемодиализа.

С учетом морфо-иммунологической и цитогенетической верификаций диагноза, результатов инструментальных методов обследования установлен клинический диагноз: «лимфома Беркитта с поражением лимфатических узлов брюшной полости, забрюшинного пространства, брыжейки, тонкой и сигмовидной кишок, кожи, плевры. Асцит. III стадия, 4-я группа риска. Синдром острого лизиса опухоли».

В отделении реанимации и интенсивной терапии начата циторедуктивная префаза протокола B-NHL-BFM 95. В связи с высоким уровнем азотемии, ферментемии и цитолизом проведена заместительная почечная терапия (три сеанса гемодиализа). С учетом повышения уровня мочевой кислоты, по данным биохимического анализа крови, (801 ммоль/л) вводили расбуриказу, что позволило уже после первого ее введения в сочетании с комплексной сопроводительной терапией снизить уровень мочевой кислоты до 375 ммоль/л. На 2-й день противоопухолевой терапии отмечены выраженный регресс кожных проявлений, уменьшение размеров живота (рисунок 8).

Дальнейшая тактика терапии соответствовала протоколу B-NHL-BFM 95 (блок АА с ритуксимабом). Учитывая крайне тяжелое состояние больного, признаки почечной недостаточности, асцит, дозу метотрексата редуцировали на 50%. Постхимиотерапевтический период осложнился развитием аплазии кроветворения, парезом кишечника, двусторонней пневмонией, кластридиальным сепсисом, что потребовало антибактериальной, гемотранфузионной, инфузионной и этиотропной терапии. С целью соблюдения тайминга терапии и снижения неблагоприятного прогностического влияния удлинения междурсового интервала на 15-й день перерыва после блока АА был введен ритуксимаб.

Второй блок полихимиотерапии (ВВ) начат на 21-й день перерыва после первого блока. По данным клинко-инструментального обследования, проведенного перед блоком ВВ, признаков опухолевого процесса не отмечено, что позволило конста-

Рисунок 8

Регресс кожных проявлений при лимфоме Беркитта на 2-й день циторедуктивной префазы (фото представлено с согласия родителей пациента)

Figure 8

Skin lesions regression in patient with Burkitt lymphoma on 2d day of cytoreductive prephase (photo provided with parental consent)



тировать полный эффект. На сегодняшний день больной полностью завершил программное лечение. По данным инструментальных методов обследования, полный противоопухолевый эффект сохраняется.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Несмотря на детальную морфо-иммунологическую и цитогенетическую характеристику лимфомы Беркитта, редкие клинические проявления заболевания представляют собой сложную задачу для врача. Пример тому – крайне редкое (казуистическое) поражение кожи при лимфоме Беркитта. В нашем клиническом примере поражение кожи было отмечено при генерализованном течении опухолевого процесса и представлено пятнисто-папулезными элементами сыпи с тенденцией к слиянию. Кожные поражения при ЛБ оказались высокочувствительны к программной полихимиотерапии и регрессировали одними из первых (на 2-й день проведения циторедуктивной префазы).

В связи с высокой химиочувствительностью ЛБ даже минимальная доза дексаметазона, введенная интраоперационно, могла вызвать синдром острого лизиса опухоли с развитием гиперкалиемии и полиорганной недостаточности. С другой стороны, развитие синдрома острого лизиса опухоли могло произойти в связи с хирургическим воздействием (повышение внутрибрюшного давления, манипу-

ляции в ходе биопсии) [10]. Но не стоит забывать и о синдроме спонтанного опухолевого лизиса при ЛБ, описанном в литературе [11–14]. Провести адекватную интенсивную терапию с привлечением методов заместительной почечной терапии оказалось возможно в условиях реанимации и интенсивной терапии.

ВЫВОДЫ

Комплексный мультидисциплинарный подход в терапии лимфомы Беркитта с привлечением реаниматологов и специалистов экстракорпоральных методов детоксикации позволяет купировать клинико-лабораторные проявления синдрома острого лизиса опухоли, провести необходимую программную полихимиотерапию и получить полный противоопухолевый эффект.

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

Valiev T.T. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1469-2365>

Shervashidze M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8350-4153>

Tupitsyn N.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Kirgizov K.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2945-284X>

Литература

- Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in african children. *Br J Surg* 1958; 46: 218–23.
- Zhang M., Jin L., Yang J., Duan Y.L., Huang S., Zhou C.J., Zhang Y.H. Clinical and prognostic analysis of 186 children with Burkitt's lymphoma. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2018 Aug 2; 56 (8): 605–10.
- Валиев Т.Т., Барях Е.А., Зейналова П.А., Ковригина А.М., Кравченко С.К., Фалалеева Н.А. и др. Оптимизация диагностики и лечения лимфомы Беркитта у детей, подростков и молодых взрослых. *Клиническая онкогематология* 2014; 7 (2): 175–83.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., et al. WHO classification of tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. Lyon France: IARC Press 2017: 581.
- Валиев Т.Т. Современная стратегия диагностики и лечения неходжкинских лимфом у детей. Дисс. д-ра мед. наук. – М., 2014, с. 239.
- Rogers A., Graves M., Toscano M., Davis L. A unique cutaneous presentation of Burkitt lymphoma. *Am J Dermatopathol* 2014 Dec; 36 (12): 997–1001.
- de Masson A., Velter C., Galicier L., Meignin V., Boutboul D., Guéry R., et al. Disseminated skin involvement in HIV-associated Burkitt lymphoma: a rare clinical feature with poor prognosis. *Br J Dermatol* 2016 Jan; 174 (1): 184–6.
- Thakkar D., Lipi L., Misra R., Yadav S.P. Skin involvement in Burkitt's lymphoma. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 2018; 11 (4): 251–2.
- Petty A.A., Walsh J.S. Cutaneous involvement with Burkitt-like lymphoma. *Am J Dermatopathol* 2007 Apr ;29 (2): 184–6.
- Dhar M., Prakash S., Pandey V., Pai V.K. Intraoperative tumor lysis syndrome in a child with Wilms' tumor. *Anesth Essays Res* 2016; 10 (1): 145–7.
- Roque W., Rehman A., Suero-Abreu G.A., Danek B.A., Colao J., Fayngersh A., et al. Spontaneous tumor lysis syndrome in T-cell malignancy: two case reports. *Stem Cell Investig* 2019; 6: 24.
- Gangireddy M., Shrimanker I., Nookala V.K., Peroutka K.A. Spontaneous Tumor Lysis Syndrome in Diffuse Large B-cell Lymphoma: Early Diagnosis and Management. *Cureus* 2019; 11 (5): 4679.
- Opyrchal M., Figanbaum T., Ghosh A., Rajkumar V., Caples S. Spontaneous tumor lysis syndrome in the setting of B-cell lymphoma. *Case Rep Med* 2010; 2010: 1–3.
- Romero B.J., Fernandez C.I., Saez H.C., Morales J.L., Garcia de la Liana F. Spontaneous tumor lysis syndrome in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *An Med Interna* 2005 Aug; 22 (8): 387–9.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-85-91

Гемаза в терапии интравитреальных кровоизлияний и гемофтальма при тромбоцитопении вследствие острого миелоидного лейкоза у детей

А.О. Копосова, А.Б. Петухова, И.И. Калинина, К.С. Антонова

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

Интравитреальные кровоизлияния – наиболее распространенное поражение зрительного анализатора у пациентов с гемобластозами. Такие пациенты имеют более низкие показатели гемоглобина и тромбоцитов по сравнению с теми, у кого геморрагий не выявлено. Гемофтальм – это проникновение крови в стекловидное тело или в одно из сформированных вокруг него пространств. Причиной этого может быть повреждение сосудов сетчатки при ее разрыве или новообразованных сосудов сетчатки, более хрупких по сравнению с нормальными. Тромбоцитопения – значительное снижение числа циркулирующих тромбоцитов ($< 100 \times 10^9/\text{л}$), которое приводит к кровотечениям. При острых лейкозах на фоне тромбоцитопении могут возникнуть офтальмологические проблемы, которые в свою очередь могут затронуть любые анатомические структуры глаза. Установлена зависимость между гематологическими показателями и характером изменений на глазном дне. В статье представлен разбор двух клинических случаев гемофтальма у пациентов с острым миелоидным лейкозом и описание динамики лечения на фоне терапии препаратом Гемаза. Родители дали согласие на использование информации, в том числе фото детей, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: гемофтальм, лейкоз, интравитреальные кровоизлияния, интравитреальные кровоизлияния, тромбоцитопения, острый миелоидный лейкоз, дети

Копосова А.О. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 85–91.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-85-91

Gemase for treatment of intraretinal hemorrhages and hemophthalmia at thrombocytopenia due to acute myeloid leukemia in children

A.O. Kopusova, A.B. Petukhova, I.I. Kalinina, K.S. Antonova

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

Intraretinal hemorrhages are the most common eye lesion in patients with hemoblastosis. Such patients have lower hemoglobin and platelet counts than those who haven't hemorrhages. Hemophthalmia is the penetration of blood into the vitreous body or into one of the spaces formed around it. The reason for this may be vessels damage of the retina or newly formed vessels of the retina, that are more fragile compared to normal. Thrombocytopenia is one of the most common hematological symptoms in different blood diseases. Thrombocytopenia is a significant decrease in the number of circulating platelets (less than $100 \times 10^9/\text{l}$), which leads to bleeding. Ophthalmic problems can occur in acute leukemia with thrombocytopenia, which can affect any anatomical structures of the eye. The relationship between hematological parameters and the nature of changes in the fundus has been established. The article provides analysis of two clinical cases of hemophthalmia in pediatric patients with acute myeloid leukemia and description of positive dynamics on therapy with Gemase. Parents gave their consent to use information about the child, including fotos, in the article.

Key words: hemophthalmia, leukemia, intraretinal hemorrhages, intravitreal hemorrhages, thrombocytopenia, acute myeloid leukemia, children

Kopusova A.O., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 85–91.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-85-91

При острых лейкозах на фоне тромбоцитопении могут возникнуть офтальмологические проблемы, которые в свою очередь могут затронуть любые анатомические структуры глаза. Вовлечение в процесс сетчатки наблюдается при остром миелоидном лейкозе чаще, чем при остром лимфобластном лейкозе. Ретинопатия часто развивается при рецидивах заболевания [1]. В основе ретинопатии может лежать лейкоэмическое поражение сетчатки, а также ее изменения вследствие анемии, тромбоцитопении или тромбоза сосудов сетчатки [1].

Наблюдаются преретинальные и интравитреальные кровоизлияния. В литературе описаны случаи, когда симптомы со стороны зрительной системы были первым проявлением рецидива заболевания [2–5]. При инициальной диагностике пациентов изменения на глазном дне выявляют лишь в 10% случаев [2].

Особенность состояния глазного дна при лейкозах заключается в ступенчатости границ диска зрительного нерва вследствие перипапиллярного отека сетчатки. Отмечается расширение и извитость вен сетчатки, неравномерность их калибра. Появ-

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 19.11.2019

Принята к печати 27.01.2020

Контактная информация:

Копосова Анастасия Олеговна, ординатор второго года обучения по специальности «гематология» НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1.
E-mail: anastasiakopusova@gmail.com

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 19.11.2019

Accepted 27.01.2020

Correspondence:

Anastasiia O. Kopusova, the resident of Hematology (2nd year), 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: anastasiakopusova@gmail.com

ляются кровоизлияния в разных слоях сетчатки, микроаневризмы, артериовенозные анастомозы, множественные поля неоваскуляризации, кровоизлияния в стекловидное тело [6–8]. Возможно развитие экссудативной отслойки сетчатки в макулярной области, которое приводит к значительному снижению зрения [9, 10]. У детей с лейкозом офтальмологические симптомы возникают редко, особенно в дебюте заболевания [7, 8, 11]. Однако S.C. Redy и B.S. Menon еще в 1998 году сообщали о большом проценте бессимптомно протекающей ретинопатии у детей. Жалобы на снижение зрения предъявляли только 3 из 14 пациентов с лейкозом, у которых отметили изменения на глазном дне [9].

При гемофтальме происходят перестройка коллоидной структуры стекловидного тела, разжижение, организация крови с швартообразованием, которое часто приводит к тракционной отслойке сетчатки и гибели глаза. Поэтому своевременное лечение внутриглазных кровоизлияний – актуальная проблема в офтальмологии.

Стекловидное тело (витреум) на 99% состоит из воды; 1% составляют коллаген и гиалуроновая кислота, ионы, белки. У взрослых витреум обычно занимает 80% глазного яблока (около 4 мл). Выделяют переднюю и заднюю гиалоидные мембраны, которые окутывают витреум снаружи. Сзади и сбоку стекловидное тело ограничено внутренней пограничной мембраной сетчатки, спереди и сбоку – непигментированным эпителием цилиарного тела, спереди – цинновыми связками и задней капсулой хрусталика. Между передней гиалоидной мембраной и задней капсулой хрусталика имеется ретролентальное пространство, а между волокнами цинновых связок, идущими от ресничного тела к хрусталику, – петитов канал, разделяемые в свою очередь гиалоидокапсулярной связкой [1, 10, 12], (рисунок 1).

Пациенты с гемофтальмом предъявляют жалобы на помутнения, появление теней, «мушек» или паутины перед глазом. Обычно гемофтальм не сопровождается болевыми ощущениями, за исключением случаев неоваскулярной глаукомы или травмы.

Патологические механизмы гемофтальма включают кровотечение из сосудов патологически измененной, травмированной сетчатки и/или его распространение на сетчатку или стекловидное тело из других внутриглазных структур. Другой часто встречающийся патофизиологический механизм гемофтальма – повреждение ретинальных сосудов, вызванное разрывом самой сетчатки или отслойкой задней гиалоидной мембраны в местах, где стекловидное тело более плотно прикрепилось к сосудам.

Очень важен тщательный сбор анамнеза заболевания (наличие сопутствующих глазных и системных заболеваний, травм и т.д.). Офтальмологическое

обследование выявляет наличие крови в стекловидном теле и/или в формируемых им пространствах. В зависимости от локализации гемофтальма картина глазного дна различна. При невозможности осмотра сетчатки (катаракта, выраженное кровоизлияние, помутнение роговицы) выполняют ультразвуковое исследование глазного яблока. В некоторых случаях для уточнения источника кровотечения проводят флюоресцентную ангиографию. При массивном кровоизлиянии возможно выявление относительного афферентного зрачкового дефекта.

В качестве профилактики интравитреальных кровоизлияний необходим контроль уровня тромбоцитов и своевременная коррекция показателей гемостаза. Пациент должен находиться под динамическим наблюдением офтальмолога, важно своевременное назначение ферментативных препаратов для лизиса кровоизлияний.

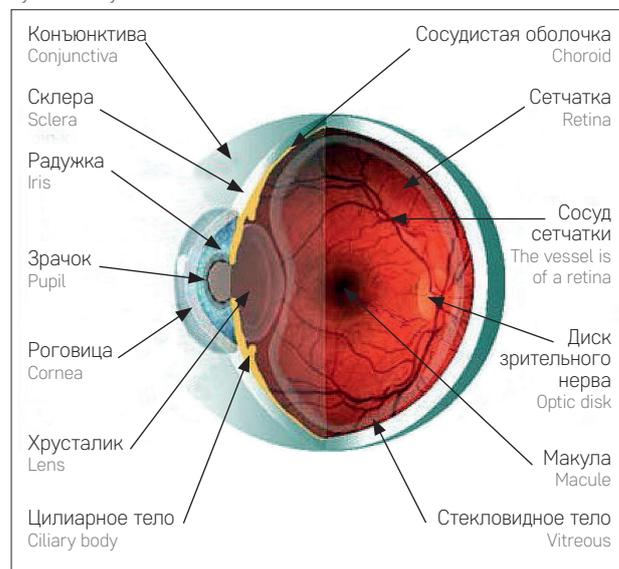
Витреальная хирургия – метод выбора при травматических массивных кровоизлияниях у пациентов без патологии гематологического статуса. Осложнения при витрэктомии происходят в 20–30% случаев. Существует препарат с доказанной эффективностью для лечения гемофтальмов – Гемаза; его активное вещество – рекомбинантный фибринолитический профермент проурокиназа, продуцируемый генетически трансформированной бактерией *Escherichia coli*. Механизм действия состоит в том, что урокиназа под действием малых доз плазмина переходит в активную форму активатора плазминогена – урокиназу, которая в свою очередь катализирует превращение плазминогена в плазмин. Плазминоген и плазмин, содержащиеся в области витреоретинального соединения, создают субстрат

Рисунок 1

Анатомия глаза

Figure 1

Eye anatomy



для действия Гемазы и запуска механизма: Гемаза > урокиназа > плазминоген > плазмин > лизис фибриновых сгустков.

Для лечения больных ферментативным методом предложена следующая схема, включающая препарат Гемаза: каждые 24 ч под конъюнктиву травмированного глаза делают инъекцию 5000 МЕ препарата, растворимого в 0,5 мл физиологического раствора; через 4–6 ч – субконъюнктивальную инъекцию 20 мг дексаметазона. Одновременно 4 раза в день проводят инстилляцию глазных капель антибактериального и противовоспалительного действия.

Е.Р. Болквядзе показала высокую эффективность лечения внутриглазных кровоизлияний с помощью препарата Гемаза в своей диссертационной работе на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Гемаза в лечении внутриглазных травматических кровоизлияний» [13]. По результатам работы полное рассасывание частичного гемофтальма было достигнуто у всех больных; субтотального гемофтальма – у 83,3% больных и тотального гемофтальма – у 40% больных. Установлено, что Гемаза в сравнении с традиционным методом лечения наиболее эффективна при сочетанных кровоизлияниях в переднюю камеру и стекловидное тело глаза: частичный гемофтальм рассосался полностью у всех больных (традиционным методом этот же результат получен при гифеме у 71% больных, при частичном гемофтальме – у 33%); субтотальный гемофтальм

рассосался у 75% больных (в группе сравнения – у 17,6%), тотальный – у 67% больных (в группе сравнения – у 11%).

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ № 1

Девочка В., 12 лет, в декабре 2018 года поступила в стационар с жалобами на слабость, вялость, резкое снижение остроты зрения на протяжении последних трех недель, появление пелены перед правым глазом. В гемограмме: лейкоциты – 1,13 тыс./мкл; нейтрофилы – 0,17 тыс./мкл; гемоглобин – 95 г/л; тромбоциты – 31 тыс./мкл.

По результатам проведенного исследования 03.12.2018 установлен диагноз: острый миелоидный лейкоз, М2-М4 вариант, трисомия 8, ЦНС-статус 0, первый острый период. Специфическая терапия по протоколу ОМЛ-MRD-2018 начата 13.12.2018, индукция АМ42Е.

Пациентку с первых дней госпитализации взял под контроль врач-офтальмолог. При первичном осмотре (14.12.2018) диагностированы массивные центральные преретинальные кровоизлияния вокруг диска зрительного нерва на обоих глазах, а также крупные очаги кровоизлияний по ходу сосудистых аркад; на правом глазе – преретинальные кровоизлияния с парамакулярной локализацией (рисунки 2).

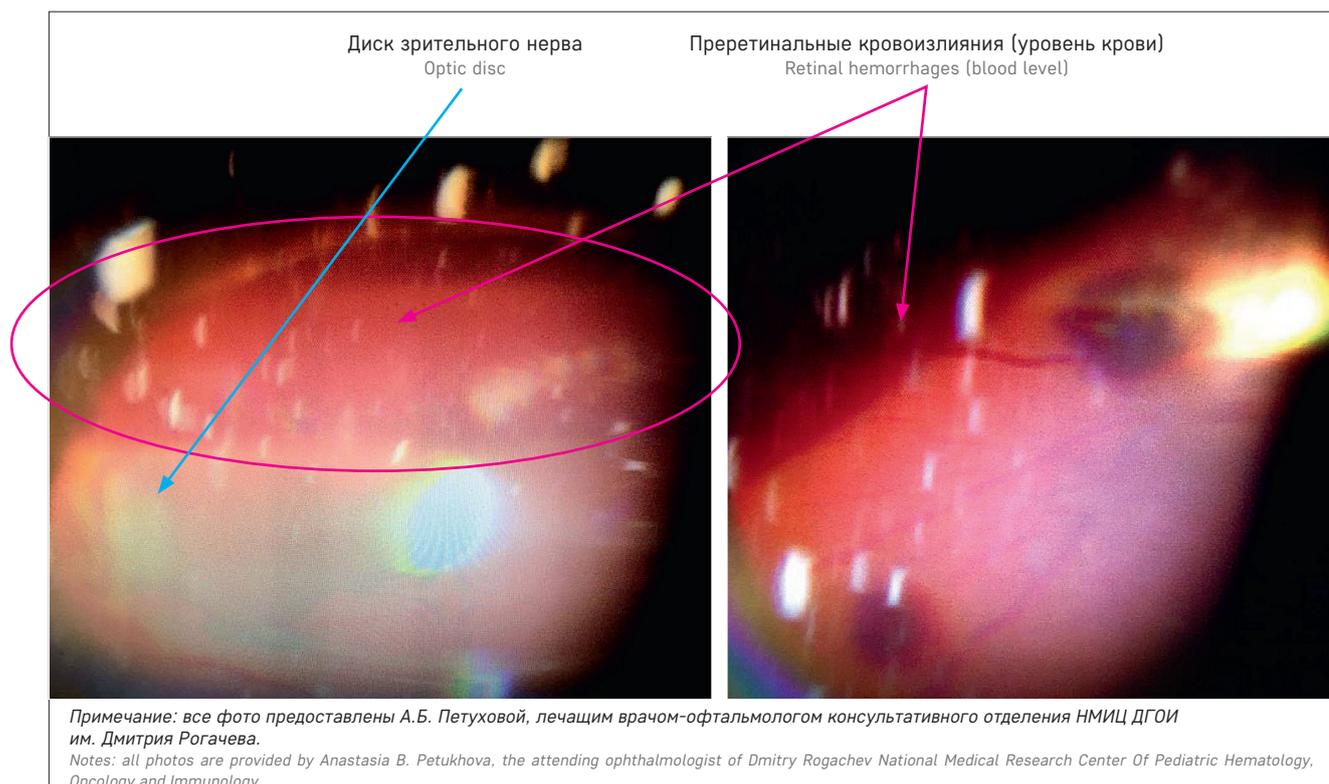
По данным УЗИ 14.12.2018) отмечено локальное утолщение оболочек заднего полюса, проминирующих в полость стекловидного тела (очаги крово-

Рисунок 2

Обратная офтальмоскопия

Figure 2

Reverse ophthalmoscopy



излияний). На обоих глазах визуализировались центральные преретинальные кровоизлияния вокруг диска зрительного нерва, по ходу сосудистых аркад; риск развития тракционного синдрома сетчатки; на правом глазу – преретинальные кровоизлияния с парамакулярной локализацией (рисунок 3).

Было принято решение о выборе разных тактиках лечения на правом и левом глазах. Проводили инстилляции каплями Гемаза и дексаметазон – форсаж в оба глаза по схеме: 6 инстилляций за один час, 2 раза в день; в правый глаз дополнительно трехкратно интравитреально вводили препарат Альтеплаза (2,5 мкг/0,1 мл) с интервалом в 2 недели.

Через 12–14 дней на фоне консервативного и инвазивного методов терапии наблюдалась положительная динамика на обоих глазах. Пациентка стала отмечать улучшение зрения. При осмотре площадь очагов кровоизлияний уменьшилась в динамике, новые очаги не отмечены. В макулярной зоне правого глаза очаг кровоизлияния приобрел форму полукруга (рисунок 4), освободив от кровоизлияния половину центральной области.

Через 4 недели терапии Гемазой преретинальные кровоизлияния находились в стадии лизиса, острота зрения увеличилась (рисунок 5). Через 1,5 мес. зрение удалось восстановить до 0,9 на правом глазу и 0,8 – на левом. При осмотре глазного дна отмечена положительная динамика: все очаги преретинальных кровоизлияний стали меньше по площади и менее интенсивны по окраске (рисунок 6).

При осмотре через 4,5 мес. (30.04.2019): предметное зрение обоими глазами с 5 метров. Диск зрительного нерва – с четкими границами, бледно-розовый; положение сосудистого пучка – центральное; ход и калибр – в норме; в макулярной зоне и на периферии – без грубой очаговой патологии. Несмотря на проводимую полихимиотерапию, заместительные трансфузии тромбоконцентрата, лечить кровоизлияния не прекращали, благодаря чему зрение удалось сохранить.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ № 2

Мальчик А., 12 лет, в декабре 2018 года поступил в стационар с диагнозом «острый миелоидный лейкоз», M2–M4 вариант с коэкспрессией CD7 для продолжения специфической терапии. Из анамнеза заболевания: ребенок болен с 30.09.2018; по данным гемограммы: лейкоцитоз – до 180 тыс./мкл; бластоз – 80%; гемоглобин – 80 г/л; тромбоцитопения – до 32 тыс./мкл. По месту жительства проведены курс индукции ADE по протоколу ОМЛ–2007 (с 08.10.2018 по 15.10.2018) и курс НАМ (с 21.11.2018 по 24.11.2018). По данным миелограммы (13.11.2018), бласты – 0,5%. При поступлении в стационар ребенок также предъявлял жалобы на резкое снижение зрения

Рисунок 3

Обратная офтальмоскопия: преретинальные кровоизлияния с парамакулярной локализацией

Figure 3

Reverse ophthalmoscopy: preretinal hemorrhages with paramacular localization

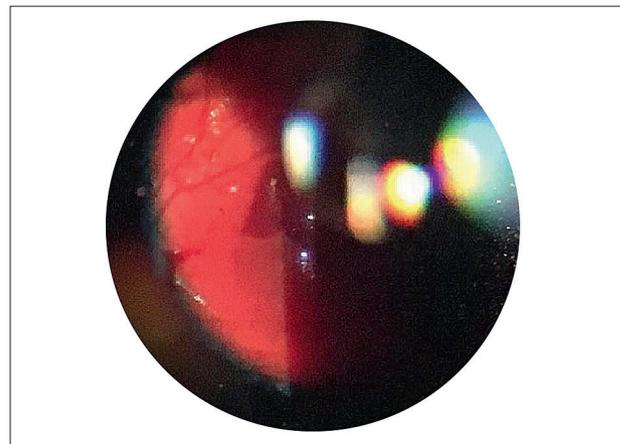


Рисунок 4

Обратная офтальмоскопия (правый глаз): очаг кровоизлияния в форме полукруга

Figure 4

Reverse ophthalmoscopy (right eye): hemorrhage in semicircular form

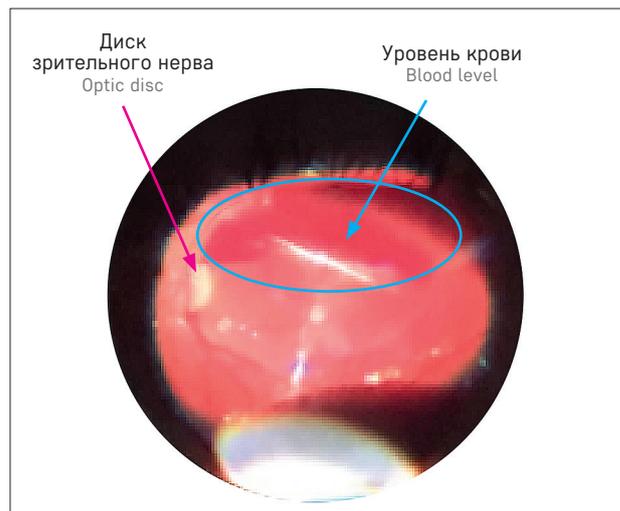


Рисунок 5

Кровоизлияния в стадии лизиса (через 4 недели терапии Гемазой)

Figure 5

Hemorrhages in the lysis stage (after 4 weeks of Hemase therapy)

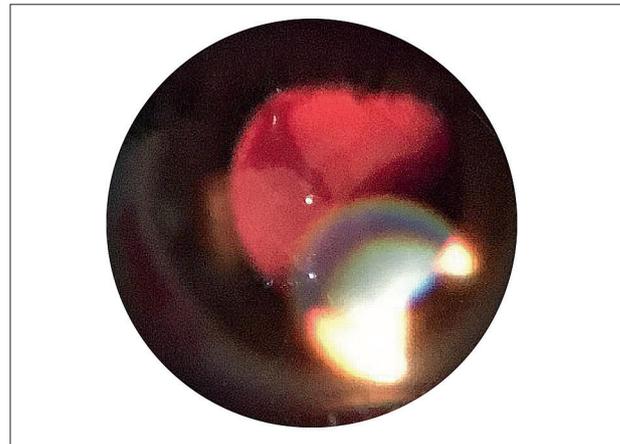
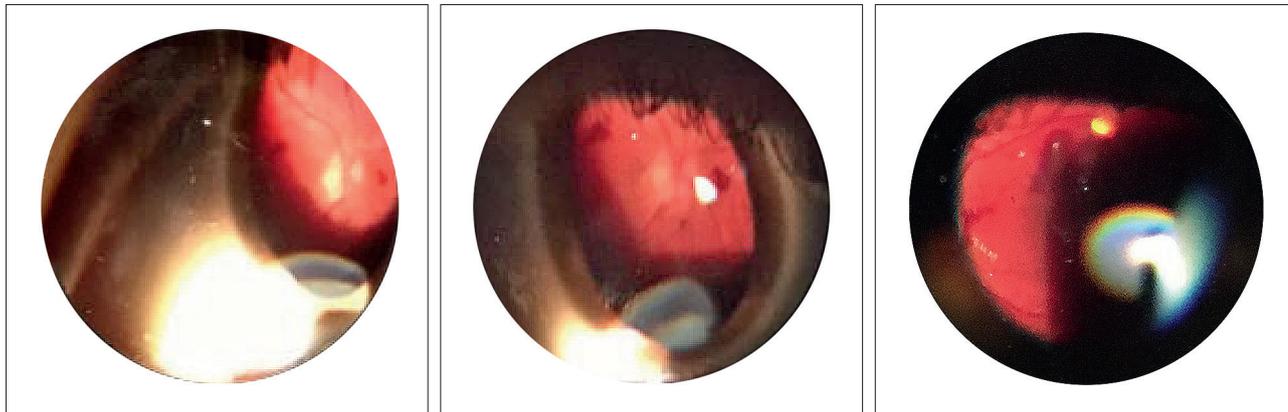


Рисунок 6

Все очаги преретинальных кровоизлияний в динамике уменьшились по площади и стали менее интенсивны по окраске (через 1,5 мес. терапии, стадия лизиса)

Figure 6

Hemorrhages have become smaller in area and less intense in color (1.5 months of therapy. Lysis stage)



после проведения первого блока химиотерапии по месту жительства, зрение не восстановилось.

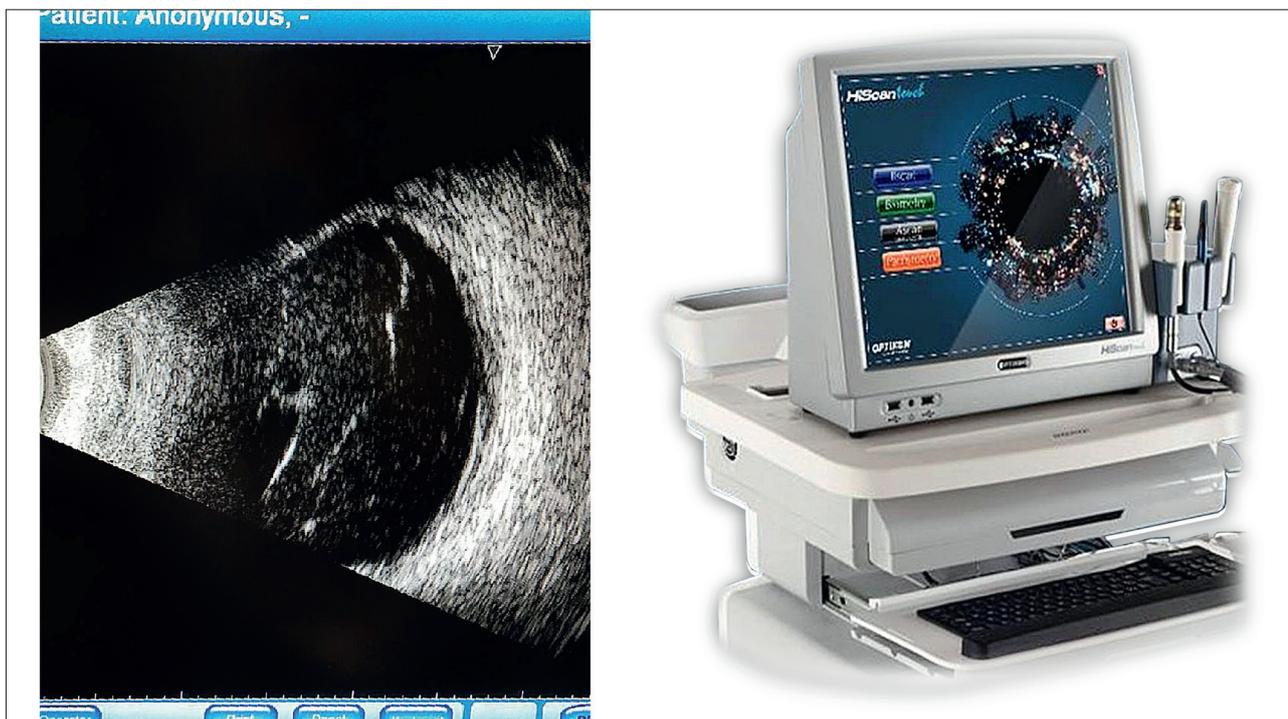
По данным УЗИ (В-скан, 12.12.2018), у ребенка имела место субтотальная отслойка сетчатки правого глаза, а также частичный гемофтальм, ретинальное кровоизлияние левого глаза (рисунок 7). Консилиум гематологов и офтальмологов принял решение проводить инстилляции капель Гемаза + дексаметазон по схеме: Тауфон 4% – форсаж в оба глаза, а на правый глаз выполнить оперативное вмешательство по поводу субтотальной отслойки сетчатки. Витрэктомию правого глаза офтальмолог-хирург выполнил 14.12.2018.

Рисунок 7

Ультразвуковое исследование: клинический случай № 2. Ультразвуковой сканер В-scan

Figure 7

Ultrasound (the 2nd clinical case). B-scan (Ophthalmic Ultrasound)



Через месяц после окончания терапии в правом глазу пациента, по данным УЗИ, – преретинально фиксированные шварты стекловидного тела; в левом – помутнения в виде взвеси и вуалей в передних слоях стекловидного тела (рисунок 8).

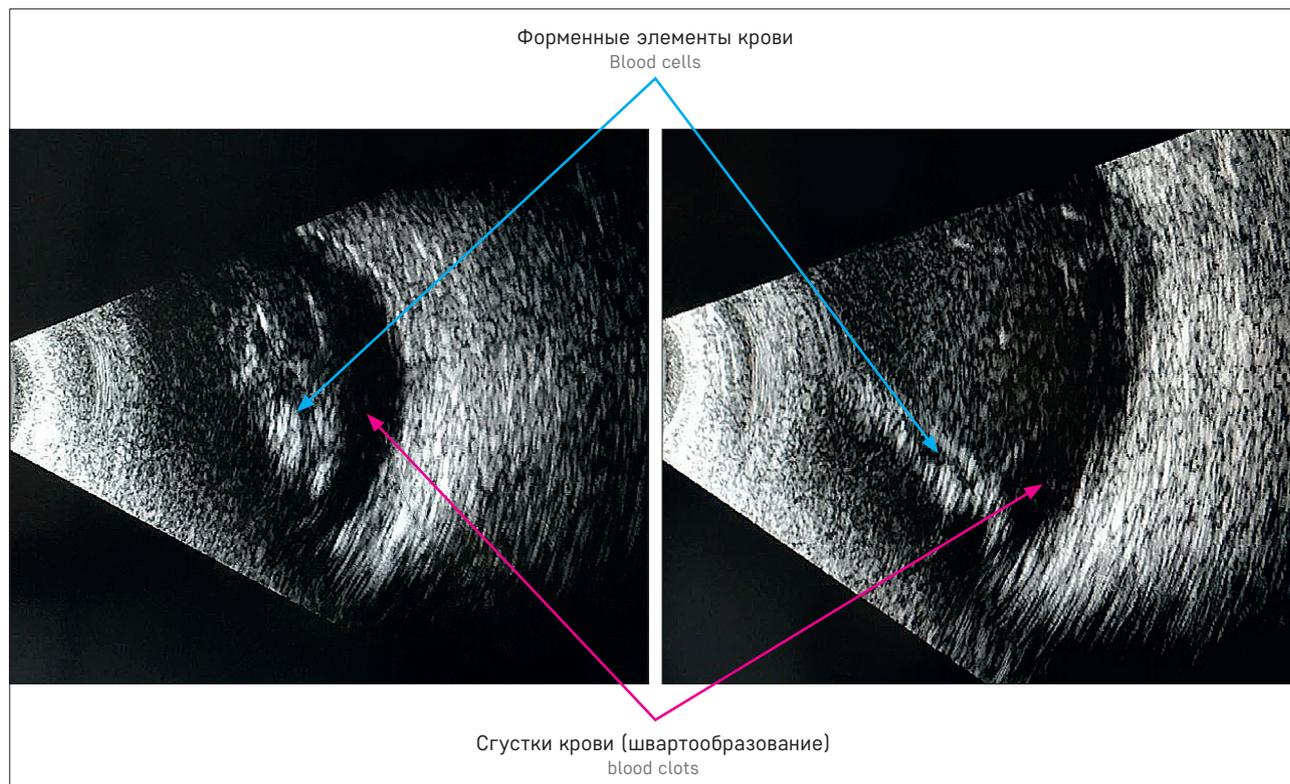
Через 1,5 мес., со слов пациента, левым глазом он видел лучше, чем правым. Зрение правым глазом – нечеткое; счет пальцев с 2 м; левым глазом – зрение предметное, видно четче, счет пальцев с 3 м. По данным УЗИ: положительная динамика в виде лизиса гемофтальма, уплотнение задних слоев над диском зрительного нерва и кнутри от него (рисунок 9).

Рисунок 8

Преретинально фиксированные шварты стекловидного тела в правом глазу пациента через 1 мес. после терапии

Figure 8

The patient has preretinally fixed vitreous blood clots in his right eye one month after therapy (blood cells, blood clots)

**Рисунок 9**

Лизис гемофтальма

Figure 9

Lysis of hemophthalmus



При осмотре через 2 мес.: предметное зрение правым глазом с 5 м, как через вуаль; такое же предметное зрение левым глазом с 5 м. Диск зрительного нерва правого глаза – за флером, видно плохо; очаги преретинального кровоизлияния около диска

зрительного нерва – на 3 и 9 ч; в левом глазу – старые очаговые преретинальные кровоизлияния; парафовеолярно в нижней трети – уровень крови, нежные шварты в стекловидном теле над диском зрительного нерва; на периферии – без грубой очаговой патологии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При сравнении эффективности консервативной терапии Гемазой и инвазивного вмешательства (интравитреальные введения Альтеплазы в первом и витрэктомия – во втором клиническом случае) показана эффективность обоих методов терапии. Скорость рассасывания кровоизлияний была одинаковой в обоих глазах и при инстилляциях капель, и при интравитреальных введениях, однако консервативный метод лечения лидирует с учетом его безопасности, доступности и простоты в использовании. Интравитреальное введение – сложное инвазивное вмешательство с высоким риском осложнения в виде развития кровотечения, а при наличии тромбоцитопении риск увеличивается. Для данного вида хирургического вмешательства нужны стабильные показатели гемограммы, а потенциальная польза должна быть выше, чем риск от манипуляции. Учитывая юный возраст пациентов и тяжесть их состояния, необходим взвешенный подход при выборе метода терапии для лечения кровоизлияний с оценкой критериев эффективности, безопасности, максимальной пользы и минимального вреда.

ВЫВОДЫ

Существует зависимость между гематологическими показателями и изменениями на глазном дне. Интравитреальные кровоизлияния – это распространенное поражение сосудов глазного дна у пациентов с тромбоцитопенией. Поражение сетчатки при лейкозе ведет к снижению остроты зрения и, как следствие, к снижению качества жизни пациента. Своевременное выявление глазной патологии у пациентов с тромбоцитопенией и назначение адекватной терапии улучшают качество жизни пациентов, а зачастую позволяют избежать полной потери зрения у больных гемобластозами.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Koposova A.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5606-4335>

Petukhova A.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5145-7874>

Kalinina I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5626>

Antonova K.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6603-5749>

Литература

- Koshy J., John M.J., Thomas S., Kaur G., Batra N., Xavier W.J. Ophthalmic manifestations of acute and chronic leukemias presenting to a tertiary care center in India. *Indian J Ophthalmol* 2015; 63 (8): 659–64. DOI: 10.4103/0301-4738.169789
- Reddy S.C., Jackson N., Menon B.S. Ocular involvement in leukemia – a study of 288 cases. *Ophthalmologica* 2003; 217 (6): 441–5.
- Lin A.L., Burnham J.M., Pang V., Idowu O., Iyer S. Ocular manifestations of primary myelofibrosis. *Retin Cases Brief Rep* 2016; 10 (4): 3647. DOI: 10.1097/ICB
- Salazar Mendez R., Fonolla Gil M. Unilateral optic disk edema with central retinal artery and vein occlusions as the presenting signs of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2014; 89 (11): 454–8. DOI: 10/1016/j.oftal.2013.10.011
- Hara Y., Kamura Y., Oikawa A., Shichino H., Mugishima H., Goto H. Case of pediatric chronic myeloid leukemia with bilateral visual loss onset. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2010; 114 (5): 459–63.
- Fackler T.K., Bearely S., Odom T., Fekrat S., Cooney M.J. Acute lymphoblastic leukemia presenting as bilateral serous macular detachments. *Retina* 2006; 26 (6): 710–2. DOI: 10.1097/01.iae.0000236484.24808.bb
- Kincaid M.C., Green W.R., Kelley J.S. Acute ocular leukemia. *Am J Ophthalmol* 1979; 87 (5): 698–702.
- Malik R., Shah A., Greaney M.J., Dick A.D. Bilateral serous macular detachment as a presenting feature of acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Ophthalmol* 2005; 15 (2): 284.
- Reddy S.C., Menon B.S. A prospective study of ocular manifestations in childhood acute leukemia. *Acta Ophthalmol Scand* 1998; 76 (6): 700–3. DOI: 10.1034/j.1600-0420.1998.760614.x
- Российская офтальмология онлайн. Избранные лекции по офтальмологии в 3-х томах; т. III, лекция № 15.
- Гусева М.Р. Изменения органа зрения у детей при общих заболеваниях. *Клиническая офтальмология* 2001; 4: 135.
- Офтальмологический портал: <https://vseoglazah.ru/eye-diseases/intraocular-hemorrhage/>
- Болквядзе Е.П. Гемаза в лечении внутриглазных травматических кровоизлияний. Автореф. дисс. канд. мед. наук. – М., 2012.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 02.10.2019
Принята к печати 18.11.2019

Сочетание гепатобластомы с опухолью желточного мешка в печени

М.М. Морозова¹, А.В. Варламов², О.В. Должанский¹, А.В. Филин¹, Д.С. Бурмистров¹, О.В. Казакова¹, Е.С. Фоминых³, Э.Ф. Ким⁴

¹ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва

³ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

⁴ ГБУЗ «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Контактная информация:
Морозова Маргарита Мироновна,
канд. мед. наук, ведущий научный
сотрудник патологоанатомического
отделения I РНЦХ им. академика
Б.В. Петровского.
Адрес: 119991, Москва, ГСП-1,
Абрикосовский пер., 2
E-mail: path.rncs@yandex.ru

Пациентка, 6 лет, поступила в Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского с диагнозом «гепатобластома правой доли печени» после проведения четырех циклов полихимиотерапии по протоколу SIOPEL (super PLADO). Гистологическое исследование, выполненное после резекции печени, выявило редкое сочетание эпителиально-мезенхимальной гепатобластомы (ГБ) и опухоли желточного мешка. Эпителиальный компонент ГБ состоял из высокодифференцированных фетальных клеток, мезенхимальный – из остеоида. Морфологическая структура второго образования соответствовала опухоли желточного мешка. Обе опухоли имели регрессивные изменения, обусловленные химиотерапией, наиболее выраженные в ГБ. В высокодифференцированном фетальном компоненте ГБ выявлялись слабая фокальная перинуклеарная экспрессия альфа-фетопротейна, экспрессия *HepPar*, мембранная экспрессия β-катенина, диффузная экспрессия глютаминсинтетазы. Фигуры митоза не определялись. Узел опухоли желточного мешка имел характерную гистологическую структуру опухоли типа эндодермального синуса с гепатоидным компонентом. В основном узле опухоли и в ее нодулярных элементах среди фиброваскулярной стромы выявлялась экспрессия альфа-фетопротейна, CD34, ядерно-цитоплазматическая экспрессия β-катенина, CDX2, редкая экспрессия PLAP и мультицитокератина, митотическая активность была высокой (21 в 10 полях зрения, ув. × 400). В доступной нам литературе имеется единственное наблюдение сочетания ГБ с опухолью желточного мешка. Родители дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: гепатобластома, опухоль желточного мешка, резекция печени, альфа-фетопротейн, иммуногистохимическое исследование

Морозова М.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 92–99.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-92-99

Combined hepatoblastoma and yolk sac tumor of the liver

M.M. Morozova¹, A.V. Varlamov², O.V. Dolzhansky¹, A.V. Filin¹, D.S. Burmistrov¹, O.V. Kazakova¹, E.S. Fominikh³, E.F. Kim⁴

¹ Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow

² M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

⁴ Moscow city oncological hospital № 62 of Moscow healthcare department, Moscow

A 6-year-old patient was admitted to the Petrovsky National Research Center of Surgery in Moscow, diagnosed with hepatoblastoma (HB) of the right lobe of the liver and after undergoing 4 cycles of SIOPEL (super PLADO) pre-operative chemotherapy. An immunohistochemistry test, performed after liver resection, revealed a rare combination of mixed epithelial and mesenchymal hepatoblastoma and yolk sac tumor. The epithelial component of HB consisted of highly differentiated fetal cells, while the mesenchymal component consisted of osteoid. The morphological structure of the second lesion corresponded to yolk sac tumor. Both tumors had regressive changes conditioned by chemotherapy: these changes were most pronounced in HB. In the highly differentiated fetal component of HB it was possible to detect a weak focal perinuclear alpha-fetoprotein expression, HepPar expression, membranous expression of beta-catenin and diffuse glutamine synthetase expression. Mitotic figures were not determined. The node of the yolk sac tumor had the characteristic histological structure of an endodermal sinus tumor with a hepatoid component. In the main tumor node and its nodular elements in the fibrovascular stroma it was possible to identify alpha-fetoprotein expression, CD34, nuclear and cytoplasmic expression of beta-catenin, CDX2, as well as a rare expression of PLAP and multi-cytokeratin, and mitotic activity was high (21 in 10 high power fields, 400x magnification). In the existing literature available to us, there is only one observation of combined hepatoblastoma and yolk sac tumor. Parents patients agreed to use personal data, including the fotos, in research and publications.

Key words: hepatoblastoma, yolk sac tumor, liver resection, alpha-fetoprotein, immunohistochemistry test

Morozova M.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 92–99.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-92-99

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 02.10.2019

Accepted 18.11.2019

Correspondence:
Margarita M. Morozova, MD,
Senior researcher, Department
of Pathology Petrovsky National
Research Center of Surgery
Address: Russia 119991, Moscow,
Abrikosovskiy lane, 2
E-mail: path.rncs@yandex.ru

Гепатобластома (ГБ) – первичная злокачественная опухоль печени. Обычно ее обнаруживают у детей в возрасте до 5 лет и крайне редко у подростков и взрослых пациентов: частота встречаемости ГБ у детей в возрасте до 1 года – 10,5 случая на 1 млн человек; в возрасте от 1 года до 5 лет – 5,2 случая. В последнее время отмечена тенденция к увеличению частоты встречаемости данной опухоли [1, 2]. Структура ГБ отражает раннюю стадию онтогенеза печени. Опухоль может состоять из одного типа эпителиальных клеток – фетальных или эмбриональных, их сочетания, но чаще наблюдаются смешанные эпителиально-мезенхимальные ГБ, в том числе с тератоидными чертами или без них; нередко недифференцированные формы. Особенности строения ГБ обусловлено разнообразие ее гистологических вариантов [3]. Имеется единственная публикация о случае сочетания смешанной эпителиально-мезенхимальной ГБ и опухоли желточного мешка у 6-месячного ребенка [4]: эпителиальный компонент ГБ состоял из клеток фетального и эмбрионального типов, мезенхимальный был представлен остеоидом. В ткани гепатобластомы и опухоли желточного мешка был выявлен альфа-фетопротеин (АФП). Обсуждая возможные пути гистогенеза этих образований, авторы полагали, что такое сочетание не было случайным, возможна их комплексная дифференцировка из единого клеточного предшественника.

В отличие от ГБ, для опухоли желточного мешка наиболее характерна первичная локализация в яичках и яичниках детей и взрослых. Экстрагонадное возникновение наблюдается в любом органе, включая переднее средостение, забрюшинное пространство, крестцово-копчиковую область и др. [5]. Первичная опухоль желточного мешка печени была впервые описана *W.R. Hart*, и до сих пор данная локализация считается редкой [6, 7]. Предполагают, что экстрагонадное возникновение опухоли может быть обусловлено присутствием местных аберрантных стволовых клеток, возникших вследствие перемещения зародышевых клеток из желточного мешка в процессе эмбрионального развития; допускают смещение бластомеров на ранней стадии эмбриогенеза и развитие опухоли из плюрипотентных соматических клеток [4, 6].

Наиболее частые первичные злокачественные опухоли у детей, к которым относятся ГБ, – опухоль желточного мешка и гепатоцеллюлярный рак, способны продуцировать АФП, вследствие чего повышенный уровень АФП в сыворотке крови пациента не может служить реальным маркером для дифференциального диагноза этих образований [8] и создает очевидные сложности в клинической диагностике сочетанных опухолей печени.

Приводим собственное наблюдение сочетания ГБ и опухоли желточного мешка. Родители дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

В возрасте 6 лет ребенка начали беспокоить боли в животе без четкой локализации, слабость, снижение аппетита, периодически возникающие тошнота и рвота. При абдоминальном ультразвуковом исследовании (УЗИ) выявлено объемное образование правой доли печени с кальцинатами в его структуре. В проекции правой печеночной вены лоцировались гиперэхогенные массы (опухолевый тромб). Инициальный уровень АФП составлял 81500 нг/мл. При мультиспиральной компьютерной томографии органов брюшной полости (МСКТ ОБП) с внутривенным контрастированием подтверждено наличие образования правой доли печени размером 7,8 × 8,4 × 5,3 см, неоднородно накапливающего контрастное вещество, с участками обызвествления в центре и признаками прорастания нижней полой вены (НПВ) со стенозированием ее просвета на протяжении 4 см (*рисунок 1 А*).

Биопсию опухоли не выполняли. На основании клиничко-рентгенологических данных диагностирована гепатобластома правой доли печени с опухолевым тромбозом НПВ. Согласно протоколу SIOPEL пациентка была стратифицирована в группу высокого риска (PRETEX II V+, P0, E0, M0); по месту жительства ей провели четыре блока полихимиотерапии (ПХТ) по протоколу SIOPEL-3 (super PLADO), на фоне которой отмечено снижение уровня АФП (*рисунок 2*). При контрольной МСКТ зарегистрировано уменьшение размера опухоли печени и распространенности опухолевого тромбоза (*рисунок 1 Б*).

Хирургический этап лечения выполнен в отделении пересадки печени Российского научного центра хирургии им. академика Б.В. Петровского. Уровень АФП накануне операции составлял 3575 нг/мл. Пациентке выполнена правосторонняя гепатэктомия с резекцией и пластикой стенки НПВ в области устья правой печеночной вены (*рисунок 3*).

Послеоперационный период протекал без осложнений. Уровень АФП на 7-е сутки после операции – 1211 нг/мл. Выписана на 13-е сутки после операции. Несмотря на R0 резекцию и полностью проведенный курс адъювантной ПХТ, через 7 мес. выявлена прогрессия заболевания в виде множественного билатерального метастатического поражения легких. Через 15 мес. после операции пациентка скончалась.

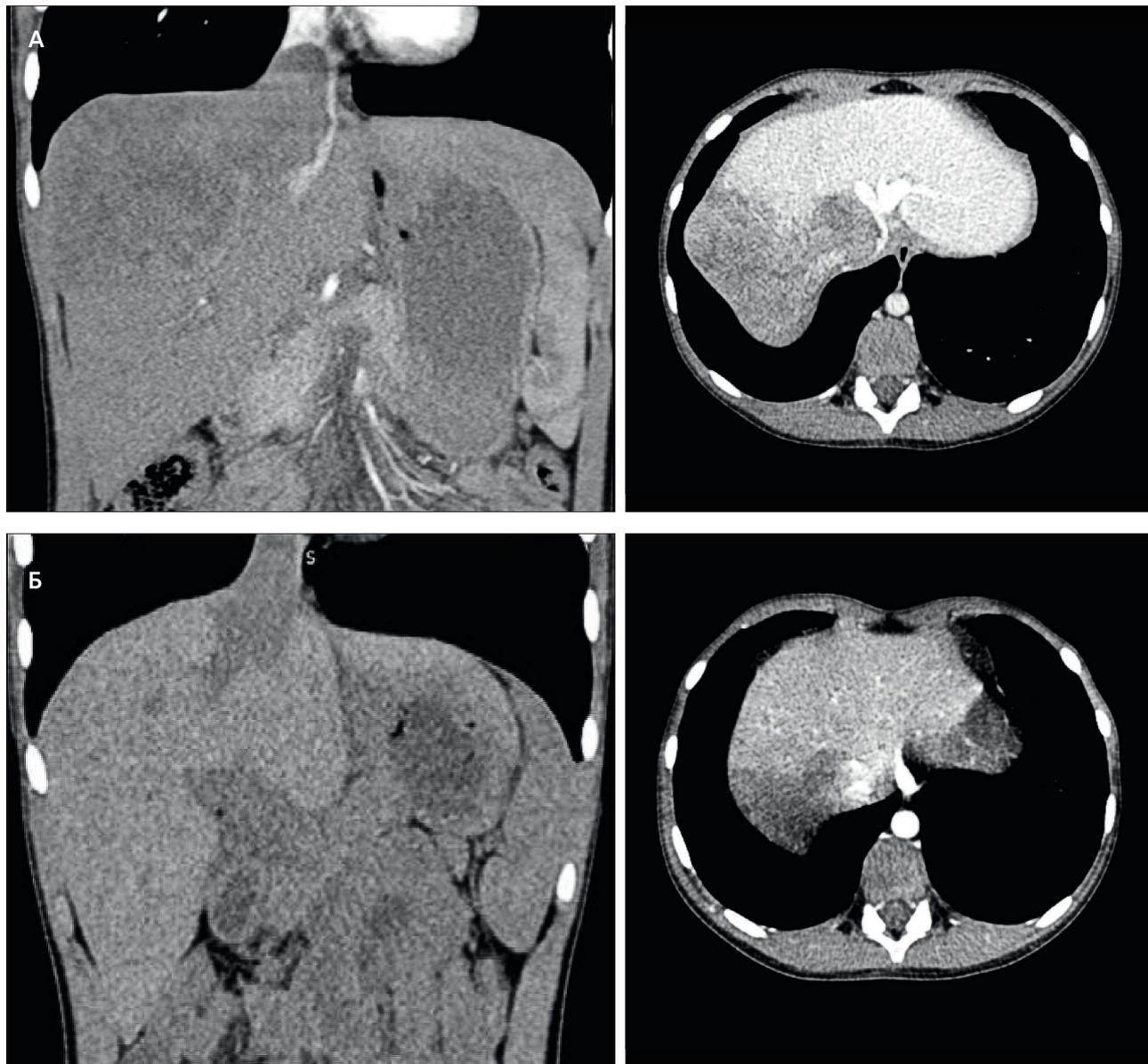
При макроскопическом исследовании правая доля печени имела размер 10 × 9,5 × 5,5 см; под капсулой в 5, 7 и 8-м сегментах определялось

Рисунок 1

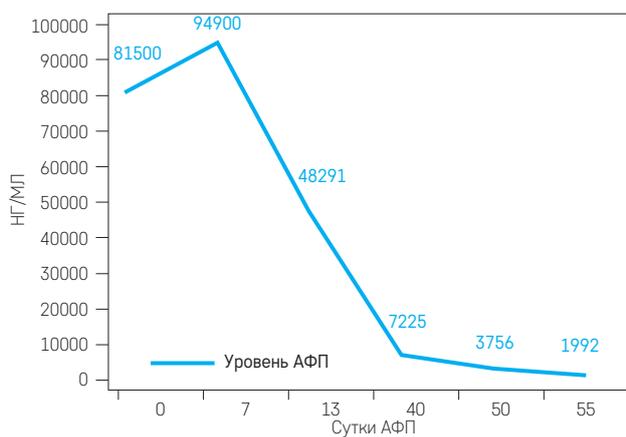
Опухоль печени до (А) и после (Б) проведения полихимиотерапии

Figure 1

Liver tumor before (A) and after (B) chemotherapy

**Рисунок 2**

Динамика уровня АФП при проведении полихимиотерапии

Figure 2 α -fetoprotein dynamics during chemotherapy

неправильной формы плотное, узловатое образование размером 3,5 × 5 × 7 см; на разрезе – пестрого вида, серовато-белого цвета, разделенное прослойками плотной белой ткани. В материале из надпеченочного сегмента НПВ были обнаружены массы смешанного тромба, а также фиброзная ткань без элементов опухоли.

Для гистологического исследования материал фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине ($pH = 7,4$), осуществляли проводку на гистопротессоре и заливали в парафин. Гистологическое исследование выполняли на срезах с парафиновых блоков, окрашенных гематоксилином и эозином.

Имуногистохимическое исследование проводили в автоматическом режиме в иммуногистостейнере (*Bond-Max, Leica*) со следующими первичными антителами: к АФП (*Cell Marque*, поликлональные; разведение – 1:100), β -катенину (*Dako*, клон β -catenin-1; разведение – 1:200), к глютаминсинтетазе (*Cell Marque*; клон GS-6; разведение – 1:50), PLAP (клон 8A9; разведение – 1:50), HepPar-1 (*Dako*; клон OCH1E5; разведение – 1:200), CD34 (*Dako*; клон QBEnd-10; разведение – 1:200), CDX2 (*Dako*; клон DAK-CDX2; разведение – 1:200), к мультцитокератину

(*Dako*; клон AE1/AE3; разведение – 1:200), СК-7 (*Dako*; клон OV-TL12/30; разведение – 1:100).

Гистологическое исследование выявило две различные опухоли, разделенные фиброзной тканью, очагами некроза и кальциноза, скоплениями макрофагов, кристаллами холестерина и островками опухолевых элементов, то есть с изменениями, описанными ранее как следствие неoadъювантной химиотерапии [9]. С одной стороны фиброзного поля обнаружили элементы смешанной эпителиально-мезенхимальной гепатобластомы, мезенхимальный

Рисунок 3

Интраоперационные фотографии: **А** – устье правой печеночной вены с опухолевым тромбом (интраоперационное УЗИ); **Б** – мобилизованный позадипеченочный отдел нижней полой вены и разделение паренхимы в объеме правосторонней гемигепатэктомии; **В** – наложение зажима на нижнюю полой вены в области устья правой печеночной вены; **Г** – окончательный вид на операционную рану после удаления правой доли печени и пластики нижней полой вены

Figure 3

Intraoperative photos: **A** – right hepatic vein with tumor clot (intraoperative US); **Б** – mobilization of inferior cava vein and performing right liver resection; **В** – clamping of right hepatic vein; **Г** – right liver resection and plastic of inferior cava vein performed

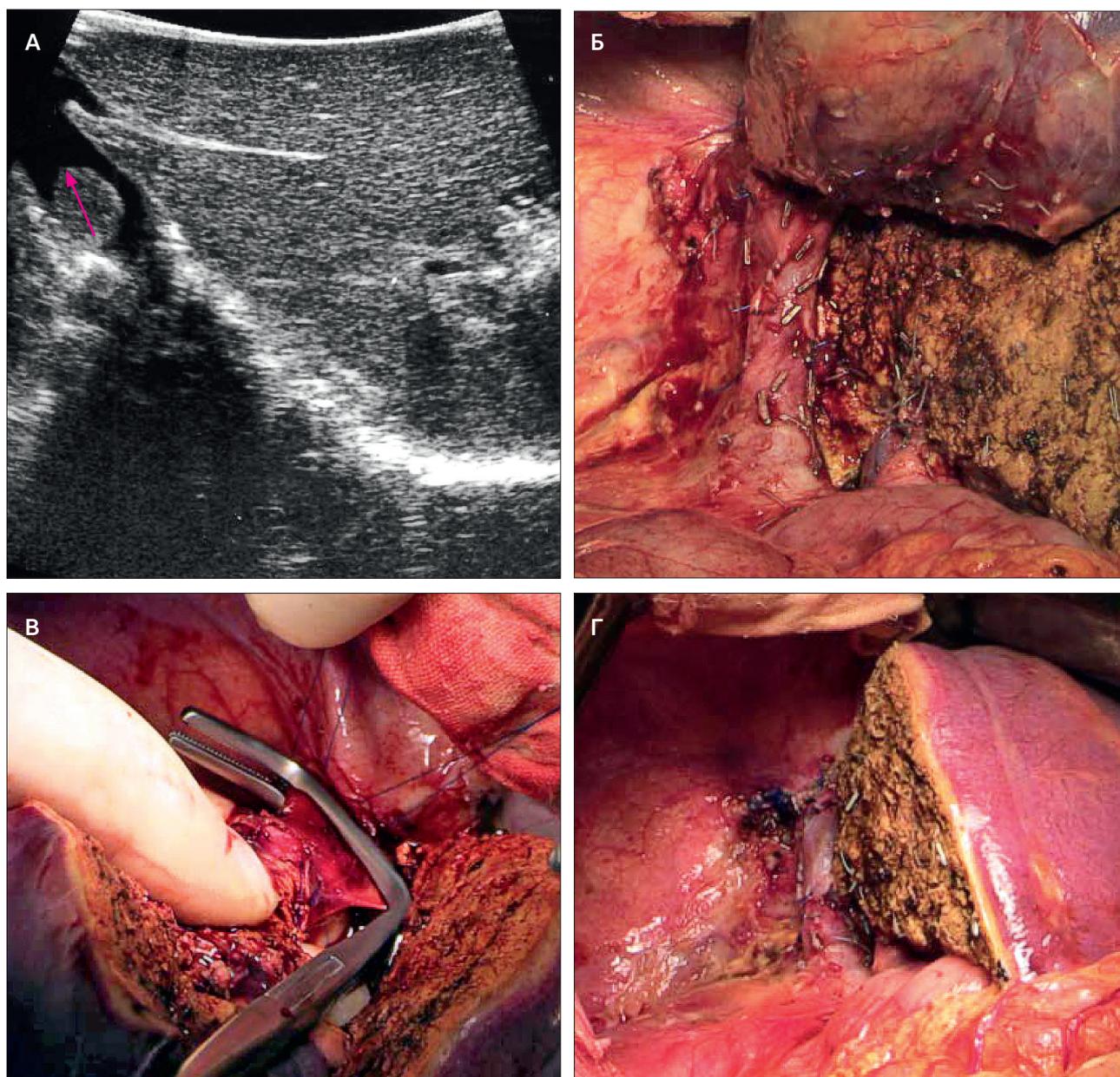
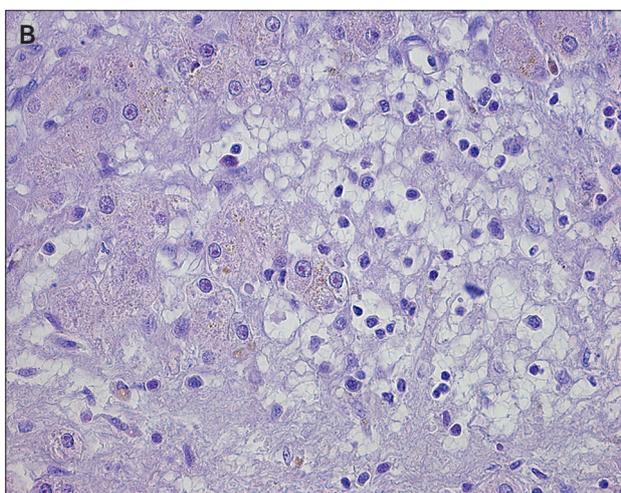
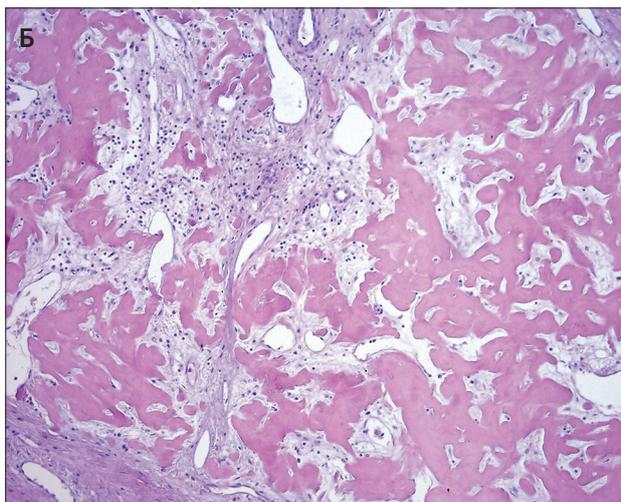
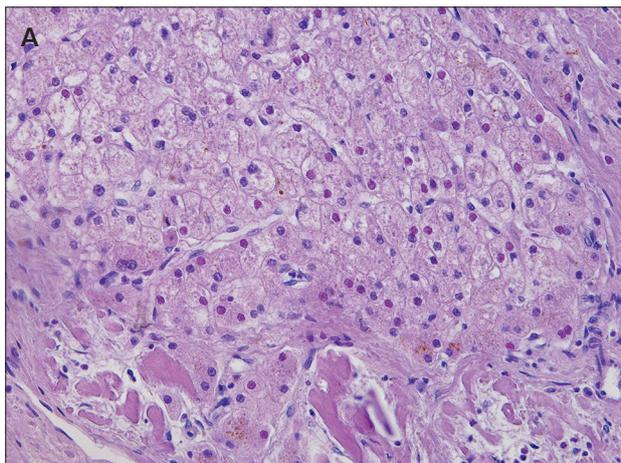


Рисунок 4

Эпителиально-мезенхимальная гепатобластома (окраска гематоксилином и эозином): **А** – эпителиальный компонент из высококодифференцированных клеток фетального типа, остеоид (внизу, слева), $\times 200$; **Б** – крупные поля остеоидной ткани, $\times 100$; **В** – дистрофические повреждения фетальных клеток, часть из них сохранила только наружные мембраны, $\times 400$

Figure 4

Mixed epithelial and mesenchymal hepatoblastoma (hematoxylin eosin stain): **A** – epithelial component is presented by well-differentiated fetal cells, osteoid (down, left), $\times 200$; **B** – large fields of osteoid, $\times 100$; **B** – dystrophic changes of fetal cells, some of them retained only the outer membranes, $\times 400$

**Рисунок 5**

Эпителиально-мезенхимальная гепатобластома (иммуногистохимическая реакция): **А** – экспрессия CD34 в эндотелии синусоидов фетального компонента в фиброваскулярной строме, $\times 200$; **Б** – слабая экспрессия АФП в цитоплазме перинуклеарной зоны фетальных клеток, $\times 400$; **В** – диффузная экспрессия глутаминсинтетазы в нодулярных фрагментах фетального компонента, $\times 200$

Figure 5

Mixed epithelial and mesenchymal hepatoblastoma (immunohistochemistry): **A** – expression of CD34 in sinusoid endothelium of fetal component in fibrovascular stroma, $\times 200$; **B** – low expression of α -fetoprotein in cytoplasm of perinuclear area of fetal cells, $\times 400$; **B** – diffuse expression of glutaminyne synthetase in nodular elements of fetal component, $\times 200$

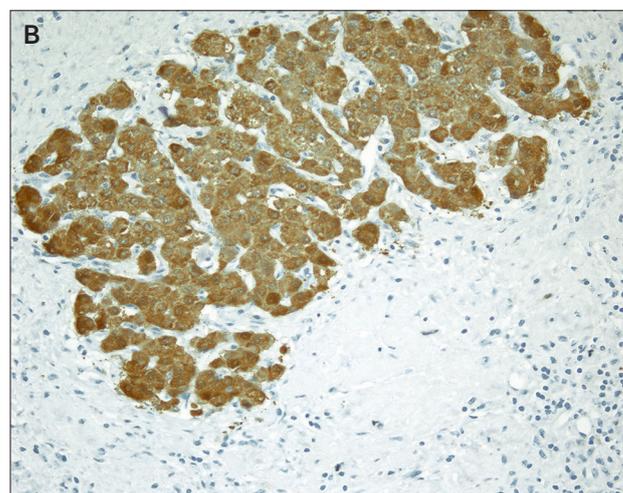
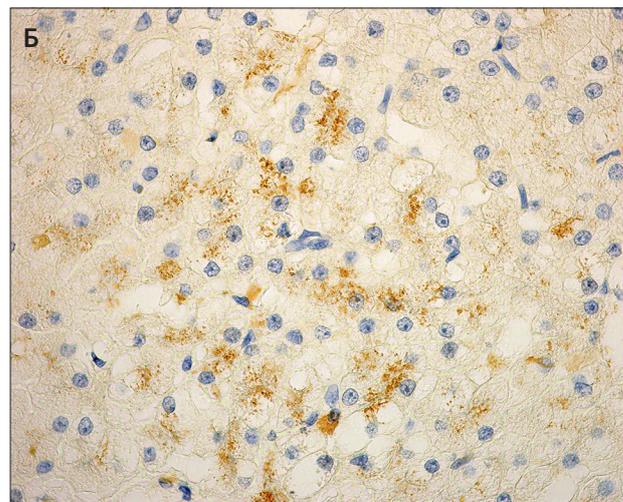
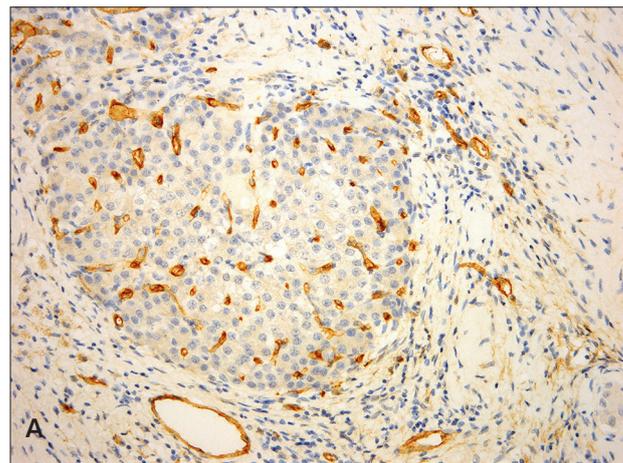


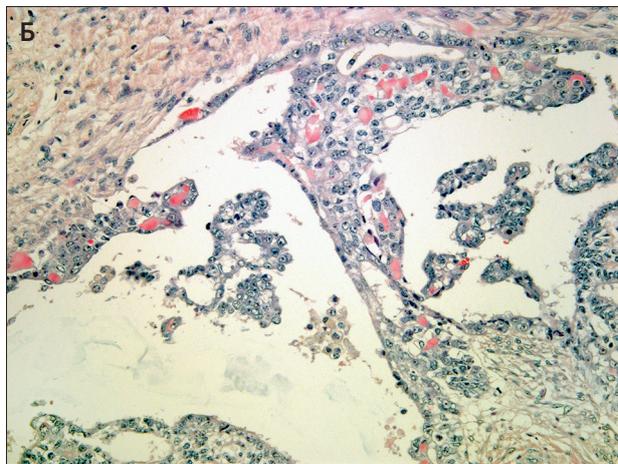
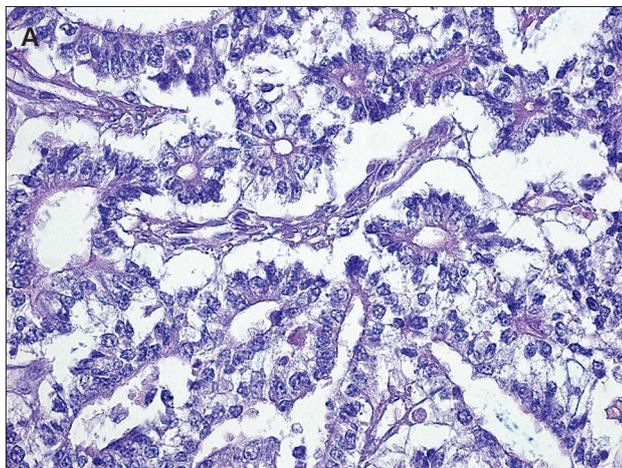
Рисунок 6

Опухоль желточного мешка (окраска гематоксилином и эозином): **А** – тельца типа Шиллера–Дювала внутри кистозных полостей опухоли, $\times 400$; **Б** – многочисленные эозинофильные гиалиновые тельца, $\times 200$

Figure 6

Yolk sac tumor (hematoxylin eosin stain): **A** – Schiller–Duval bodies inside the cystic cavities of a tumor, $\times 400$;

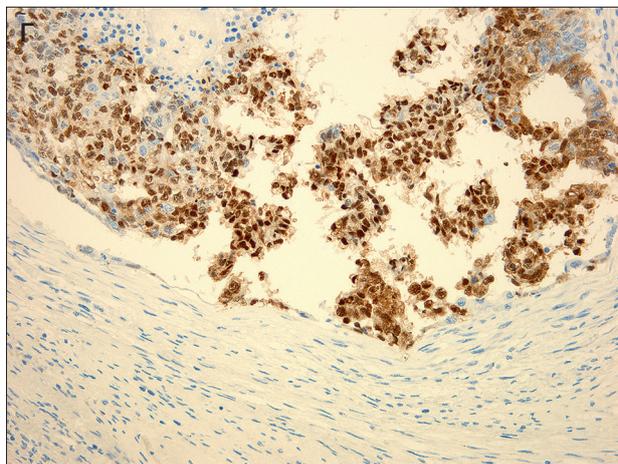
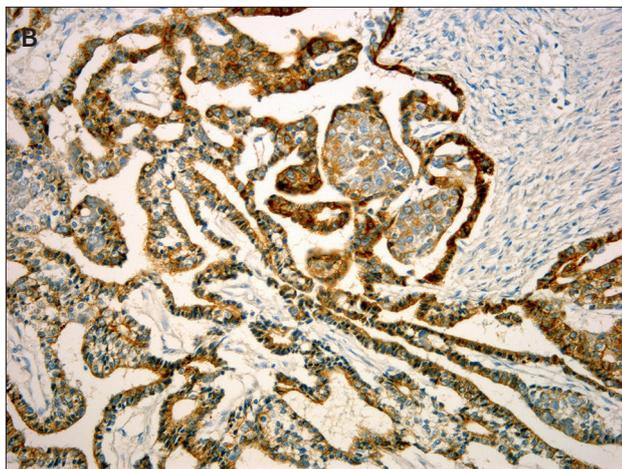
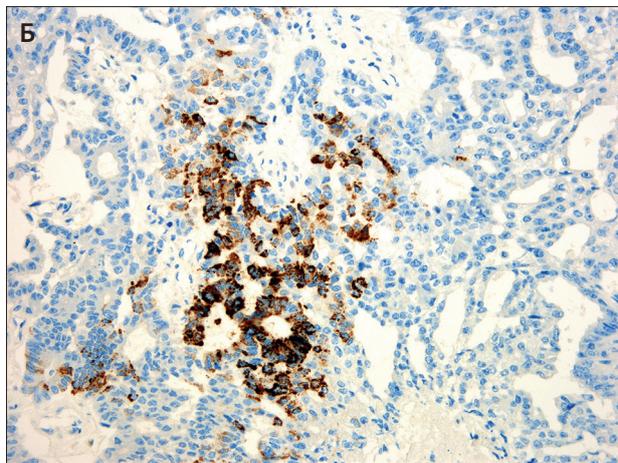
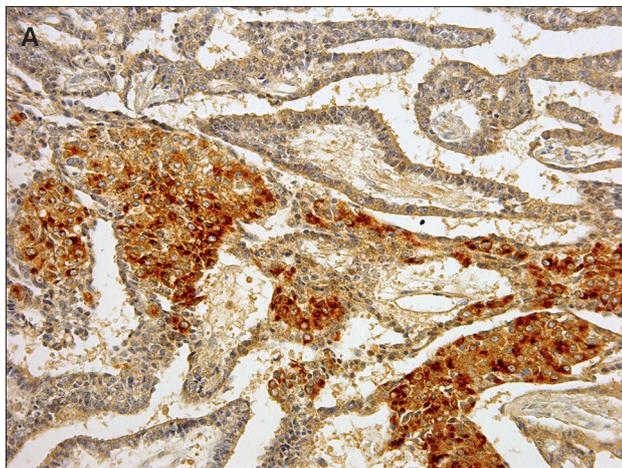
Б – numerous eosinophilic hyaline bodies, $\times 200$

**Рисунок 7**

Опухоль желточного мешка (иммуногистохимическая реакция): **А** – сильная экспрессия АФП в строме опухоли желточного мешка, $\times 100$; **Б** – сильная экспрессия HepPar в гепатоидном компоненте опухоли желточного мешка; **В** – диффузная цитоплазматическая экспрессия мультицитокератина в эпителиальной выстилке кистозных полостей опухоли желточного мешка, $\times 200$; **Г** – сильная экспрессия CDX2 в ядрах эпителиальной выстилки желточного мешка, $\times 200$

Figure 7

Yolk sac tumor (immunohistochemistry): **A** – high expression of α -fetoprotein in yolk sac tumor stroma, $\times 100$; **Б** – high expression of HepPar in hepatoid component yolk sac tumor; **В** – diffuse cytoplasmic expression multicytokeratin in epithelial cystic lining of yolk sac tumor, $\times 200$; **Г** – high expression CDX2 in the nuclei of the epithelial lining yolk sac, $\times 200$



компонент которой состоял из остеоида в соседстве с эпителиальным компонентом и очагами внекостно-мозгового кроветворения. Эпителиальный компонент состоял из высококодифференцированных фетальных клеток с широким ободком цитоплазмы, центрально расположенными ядрами и мелкими ядрышками. Имелись очаги дистрофических изменений; часть клеток была представлена только контурами оболочек с пустой цитоплазмой (рисунки 4). Фигуры митоза отсутствовали. В полях фетального компонента портальные тракты и желчные протоки не выявлялись. В более крупных фрагментах фетального компонента имелись участки цитоархитектуральной перестройки, разделенные синусоидами, выстланными эндотелием, иммунореактивным к CD 34 (рисунки 5 А). В клетках фетального компонента выявлялась слабая фокальная экспрессия АФП в виде цитоплазматической околядерной зернистости (рисунки 5 Б), мембранозная экспрессия β -катенина, диффузная экспрессия глутаминсинтетазы (рисунки 5 В), цитоплазматическая экспрессия *HepPar*. Экспрессия CDX2, PLAP, CK7 и мультицитокератина (AE1/AE3) не определялась.

Второе образование имело структуру опухоли желточного мешка типа эндодермального синуса, растущего в виде узла. С одной стороны к узлу прилежала ткань печени с пролиферирующими желчными протоками, с другой – фиброваскулярное поле с очагом некроза и микрокальцинатами. Узел опухоли состоял из кистозных полостей, разделенных прослойками фиброзной ткани, внутренняя поверхность которых была выстлана уплощенным париетальным эпителием, лежащим на базальной мембране; в просветах полостей определялись структуры Шиллера-Дювала (рисунки 6 А). Основа их состояла из рыхлой или плотной соединительной ткани, выстланной снаружи эпителием; в центральной части соединительнотканной стромы определялись тонкостенные сосуды, эндотелий которых экспрессировал CD34. В строме и просветах полостей присутствовали эозинофильные гиалиновые тельца (рисунки 6 Б). В опухоли имелись мелкие и более крупные очаги солидного строения из полигональных клеток с эозинофильной цитоплазмой и круглыми центрально расположенными ядрами. Клетки солидных структур экспрессировали АФП (рисунки 7 А), здесь же выявлялись гепатоидные клетки с сильной экспрессией *HepPar* (рисунки 7 Б). В эпителиальной выстилке внутренних структур кистозных полостей определялась выраженная сильная диффузная цитоплазматическая экспрессия мультицитокератина (AE1/AE3) (рисунки 7 В), ядерная экспрессия CDX2 (рисунки 7 Г) и ядерная экспрессия β -катенина. Отдельные группы немногочисленных клеток экспрессировали PLAP. Отсутствовала экспрессия CK7. Нодулярные эле-

менты опухоли, располагавшиеся вблизи основного узла в фиброваскулярной строме, сохраняли все особенности гистологического строения и иммунофенотип основного узла. Митотическая активность клеток данного компонента опухоли была высокой – 21 митоз в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приведен редкий случай сочетания эпителиально-мезенхимальной гепатобластомы и опухоли желточного мешка печени у 6-летней пациентки. Исследование резецированной опухоли провели после предоперационных курсов полихимиотерапии по схеме лечения ГБ. Морфологическое исследование показало, что обе опухоли имели признаки регрессивных изменений, наиболее выраженных в ГБ. Несмотря на вторичные изменения, гистологическая структура ГБ соответствовала эпителиально-мезенхимальному типу опухоли, в которой мезенхимальный компонент состоял из остеоида, а эпителиальный был представлен высококодифференцированными фетальными клетками. Иммуноморфологическая особенность эпителиального компонента ГБ в данном случае – мембранная экспрессия β -катенина и диффузная экспрессия глутаминсинтетазы, что наблюдается в нормоподобном варианте фетальной ГБ. Диффузная экспрессия глутаминсинтетазы в подобном варианте эпителиального компонента опухоли рекомендуется для исследования резидуальной опухолевой ткани после неoadьювантной химиотерапии для подтверждения опухолевой природы высококодифференцированных фетальных клеток [10].

Второе образование полностью сохраняло характерную гистологическую структуру опухоли желточного мешка типа эндодермального синуса как в основном узле, так и в нодулярных островках фиброваскулярной стромы. Выявленные иммуноморфологические особенности свидетельствовали о разнонаправленной дифференцировке клеток опухоли желточного мешка. В эпителиальной выстилке внутрикистозных структур имелась выраженная экспрессия CDX2, редкая фокальная экспрессия PLAP, сильная диффузная экспрессия мультицитокератина. Сольный компонент опухоли состоял в основном из скоплений гепатоидных клеток с сильной экспрессией АФП и *HepPar*. Ранее в исследованиях отмечали присутствие гепатоидного компонента в опухоли желточного мешка [11, 12]. В отличие от ГБ, в клетках опухоли желточного мешка была выявлена высокая митотическая активность, ядерная экспрессия β -катенина и диффузная цитоплазматическая экспрессия мультицитокератина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сочетание эпителиально-мезенхимальной ГБ и опухоли желточного мешка представляет собою редкую комбинацию двух образований. В описанном нами случае эпителиально-мезенхимальная ГБ имела высокодифференцированный фетальный компонент, мезенхимальный состоял из остеоида. Опухоль желточного мешка имела типичную структуру опухоли типа эндодермального синуса с гепатоидным компонентом. Признаки регрессивных изменений, связанных с терапией, имели обе опухоли. Наиболее значительные изменения наблюдались в эпителиальном компоненте ГБ. Гистологическое строение и выявленный иммунофенотип опухоли желточного мешка в основном узле и ее нодулярных элементах среди фиброваскулярной стромы совпадали.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Morozova M.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2045-1226>

Varlamov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9866-9567>

Dolzansky O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1437-7645>

Filin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4205-5627>

Burmistrov D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3825-7912>

Kazakova O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0945-778X>

Fominikh E.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6899-4767>

Kim E.F. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1806-9180>

Литература

- Czauderna P., Lopez-Terrada D., Hiyama E., Häberle B., Malogolowkin M.H., Meyers R.L. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Current Opinion in Pediatrics* 2014; 26 (1): 19–28. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000046
- Spector L.G., Birch J. The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatric Blood and Cancer* 2012; 59 (5): 776–9. DOI: 10.1002/pbc.24215
- Tanaka Y., Inoue T., Horie H. International pediatric liver cancer pathological classification: current trend. *Int J Clin Oncol* 2013; 18 (6): 946–54. DOI: 10.1007/s10147-013-0624-8
- Cross S.S., Variend S. Combined hepatoblastoma and yolk sac tumor of the Liver. *Cancer* 1992; 69: 1323–6. DOI: 10.1002/1097-0142 (19920315)69:6<1323::aid-cnrc2820690604 >3.0.co;2-1
- O'Sullivan P., Daneman A., Helen S.L., Chan H.S., Smith C., Robey G., Fitz C., Martin D.J. Extragonadal endodermal sinus tumors in children: a review of 24 cases. *Pediatric Radiology* 1983; 13: 249–57. DOI: 10.1007/bf00973340
- Hart W.R. Primary endodermal sinus (yolk sac) tumor of the liver. First Reported case. *Cancer* 1975; 35: 1453–8. DOI: 10.1002/1097-0142(197505)35:5<1453::aid-cnrc2820350533>3.0.co;2-u
- Шабанов М.А., Пашков Ю.В., Сухарев А.В., Керимов П.А., Поляков В.Г. Опухоль желточного мешка с первичной локализацией в печени: описание наблюдения и обзор литературы. *Детская онкология* 2005; 1: 39–44.
- Putra J., Ornvold K., Suriawinata A.A. Primary hepatic yolk sac tumor: a case report of a ruptured tumor in 22-month-old boy. *JSM Clinical Case Reports* 2014; 2 (1): 1015.
- Wang L.L., Filippi R.Z., Zurakowski D., Archibald T., Vargas S.O., Voss S.D., et al. Effects of neoadjuvant chemotherapy on hepatoblastoma: a morphologic and immunohistochemical study. *The American Journal of Surgical Pathology* 2010; 34 (3): 287–99. DOI: 10.1097/pas.0b013e3181ce5f1e
- Huang W.-J., Tsai J.-H., Jeng Y.-M. Complementary roles of β -catenin and glutamine synthetase immunostaining in diagnosis of chemotherapy-treated and untreated hepatoblastoma. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017; 116 (7): 549–53. DOI: 10.1016/j.jfma.2016/09/013
- Nakashima N., Fukatsu T., Nagasaka T., Sabue M., Takeuchi J. The frequency and histology of hepatic tissue in germ cell tumors. *American Journal of Surgical Pathology* 1987; 11 (9): 682–92. DOI: 10.1097/00000478-198709000-00004
- Jacobsen G.K., Jacobsen M. Possible liver cell differentiation in testicular germ cell tumors. *Histopathol* 1983; 7 (4): 537–48. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1983.tb02266.x

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 05.11.2019
Принята к печати 23.12.2019

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107

Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича

А.А. Мартьянов^{1, 2, 3, 4}, Д.С. Морозова³, А.Л. Хорева², М.А. Пантелеев^{1, 2, 3, 5}
А.Ю. Щербина², А.Н. Свешникова^{1, 2, 3, 6}

¹ ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва
³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва
⁴ ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, Москва
⁵ ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт», Москва
⁶ ФГАУ 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

Одна из ключевых особенностей синдрома Вискотта–Олдрича (СВО), редкого X-сцепленного иммунодефицитного состояния, – микротромбоцитопения, приводящая к спонтанным/посттравматическим кровотечениям. Причиной развития синдрома Вискотта–Олдрича является мутация в гене белка WASP, участвующего в поляризации актина и перестройке актинового цитоскелета. Механизм влияния данной мутации на внутриклеточную кальциевую сигнализацию, а также функциональные ответы тромбоцитов пациентов с СВО не уточнены. Цель исследования: анализ кальциевой сигнализации, изменения формы и связывания фибриногена тромбоцитами пациентов с СВО. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В исследование были включены 3 пациента с СВО и 3 здоровых добровольца. Внутриклеточная сигнализация и функциональные ответы тромбоцитов наблюдались на проточном цитометре *BD FACS Canto II*. Для измерения концентрации кальция в цитозоле тромбоцитов использовали флуорофор *Fura-Red*; изменение формы тромбоцитов при активации оценивали по боковому светорассеянию клеток на длине волны 488 нм; активацию тромбоцитарных интегринов – по связыванию флуоресцентно-меченного фибриногена. Во время активации концентрация тромбоцитов составляла 1000 клеток/мкл во избежание эффекта вторичной активации. В покое состоянии тромбоцитов наблюдалась повышенная концентрация кальция в цитозоле тромбоцитов пациентов по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров. В ответ на стимуляцию максимально достижимые концентрации кальция были сопоставимы в обоих случаях. Связывание фибриногена с тромбоцитами пациентов не было значимо изменено по сравнению со здоровыми донорами. С другой стороны, изменение формы клеток в ответ на активацию, выраженное в процентах, у пациентов оказалось более значимым, чем изменение формы тромбоцитов здоровых доноров. При схожих максимальных ответах на стимуляцию всеми агонистами концентрация кальция в покое тромбоцитах, а также изменение формы тромбоцитов у пациентов с СВО значимо выше, чем у тромбоцитов здоровых доноров. Данные результаты можно объяснить увеличенным отношением площади мембраны тромбоцитов к их объему.

Ключевые слова: тромбоциты, синдром Вискотта–Олдрича, кальциевая сигнализация, проточная цитометрия, орфанные заболевания

Мартьянов А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 100–107.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107

Specific features of intracellular calcium signalling, distinctive for Wiskott-Aldrich syndrome patients

A.A. Martyanov^{1, 2, 3, 4}, D.S. Morozova³, A.L. Khoreva², M.A. Panteleev^{1, 2, 3, 5}
A.Yu. Shcherbina², A.N. Svshnikova^{1, 2, 3, 6}

¹ Centre for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology Russian Academy of Sciences, Moscow
² Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow
³ Lomonosov Moscow State University, Moscow
⁴ Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow
⁵ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow
⁶ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a rare X-linked immunodeficient disease accompanied by microthrombocytopenia, which leads to spontaneous/post-traumatic haemorrhages. It has been demonstrated that WAS is caused by gene mutation of WASP protein, which is participating in the processes of actin polarization and actin cytoskeleton re-organisation. It is yet unknown how this mutation affects intracellular signalling and functional responses of platelets of patients with WAS. Assessment of the intracellular calcium signalling, shape change and fibrinogen binding by the platelets of WAS patients. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. Three patients with WAS and three healthy volunteers were included in the study. Intracellular signaling and platelet functional responses were observed on a BD FACS Canto II flow cytometer. To measure the calcium concentration in the platelet cytosol, the Fura-Red fluorophore was used, platelet shape change upon activation was evaluated by side scattering of cells at a wavelength of 488 nm, platelet integrin activation was evaluated by binding of fluorescently-labeled fibrinogen. During activation, the platelet concentration was 1000 cells per ul to avoid the effects of secondary activation. In quiescent state of platelets, an increased concentration of calcium in the cytosol of platelets of patients was observed compared with platelets of healthy donors. In response to stimulation, the highest achievable calcium concentrations were comparable in both cases. The binding of fibrinogen to platelets in patients was not significantly changed compared to healthy donors. On

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 05.11.2019
Accepted 23.12.2019

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

the other hand, the change in the shape of the cells in response to activation, expressed as a percentage, was more significant in patients than the change in the shape of the platelets of healthy donors. With similar maximum responses to stimulation by all agonists, the concentration of calcium in resting platelets, as well as the change in the platelet shape of patients with WAS is significantly higher than that of healthy platelet donors. These results can be explained by the increased ratio of the platelet membrane area to their volume.

Key words: *platelets, Wiskott–Aldrich Syndrome, calcium signalling, flow cytometry, orphan disease*

Shamanskaya T.V., et al. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*, 2020; 19 (1): 100–107.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107

Синдром Вискотта–Олдрича (СВО) – редкое X-сцепленное иммунодефицитное состояние, характеризующееся тромбоцитопенией, восприимчивостью к инфекциям и такими осложнениями, как атопический дерматит, аутоиммунные и злокачественные заболевания [1, 2]. Этиология этого синдрома заключается в различных мутациях гена, кодирующего белок WASp [3]. Данный белок играет важную роль в полимеризации актина, перестройке цитоскелета гематопозитических клеток при активации [4], в том числе при формировании иммунологического синапса [5].

СВО характеризуется различной тяжестью и степенью выраженности симптомов. Однако тромбоцитопения, в отличие от остальных проявлений, – постоянный симптом этого заболевания, приводящий к спонтанным и/или посттравматическим эпизодам кровотечения. За редким исключением, маленький размер тромбоцитов является патогномоничным признаком СВО [6]. Механизмы возникновения тромбоцитопении изучены не до конца: исследования пациентов с данным синдромом и нокаутных по гену WASp мышей показывают как нарушение тромбопоэза в костном мозге [7], так и нормальную продукцию тромбоцитов [8]. Другие исследования объясняют тромбоцитопению усиленным фагоцитозом тромбоцитов макрофагами селезенки [9], возможно, в связи с увеличенным экспонированием фосфатидилсерина на их поверхности [10] или наличием антитромбоцитарных антител [11]. Несмотря на то что большая часть функций тромбоцитов при СВО сохранена, существуют работы, показывающие дефицит плотных гранул [12, 13], а также склонность к запланированной клеточной гибели в связи с малым количеством митохондрий в данных тромбоцитах [14].

Диагностика СВО проводится у мальчиков с изолированной тромбоцитопенией или тромбоцитопенией с сопутствующими дерматитом, рецидивирующими инфекциями, аутоиммунными и злокачественными заболеваниями. Однако количество тромбоцитов у разных пациентов сильно варьирует, что затрудняет лабораторную диагностику [15], поэтому необходимо также учитывать маленький размер тромбоцитов, высокий процент незрелых тромбоцитов [16], тромбоцитов с повышенным экспонированием фосфатидилсерина [17] и показатели

гемостатических тестов [18]. Окончательный диагноз может быть подтвержден при определении мутации гена WAS [19]. Использование проточной цитометрии – это метод, позволяющий быстро подтвердить диагноз при полном отсутствии или сниженной экспрессии WASp в лимфоцитах периферической крови пациентов, однако в редких случаях СВО экспрессия WASp остается нормальной [20].

Большинство сигнальных путей в тромбоцитах приводит к изменению концентрации свободных ионов кальция в цитозоле, которая, в свою очередь, запускает функциональные ответы тромбоцитов – изменение формы, проагрегантную и прокоагулянтную активность [17, 21]. Анализ кальциевой сигнализации в ответ на стимуляцию различными агонистами позволяет всесторонне оценить потенциальные функциональные нарушения в тромбоцитах, а также идентифицировать новые маркеры, специфичные для различных заболеваний, в данном случае – для синдрома Вискотта–Олдрича.

Цель исследования: анализ изменения концентрации кальция и функциональных ответов (изменения формы и связывания фибриногена) тромбоцитов здоровых доноров и пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича методом проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Проанализированы образцы от трех пациентов в возрасте 8 мес., 10 мес. и 2 лет с тромбоцитопенией в составе синдрома Вискотта–Олдрича ($27\text{--}51 \times 10^9/\text{л}$ тромбоцитов), госпитализированных в НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России в 2019 году. Диагноз подтвержден выявлением мутаций гена WAS (таблица 1). На момент постановки эксперимента терапию агонистами ТПР не проводили. В качестве контроля использовали кровь здоровых молодых доноров (до 20 лет).

В исследовании были использованы следующие материалы: чувствительный к концентрации кальция, проникающий сквозь липидные мембраны клеток флуорофор *Fura-Red-AM* (*Molecular Probes, Eugene, Oregon, США*); фукоидан из водорослей

Таблица 1

Пациенты, включенные в исследование

Table 1

Patients, included in the study

Пациент Patient	Возраст Age	Мутация WAS WAS mutation	Экспрессия WASP WASP expression
Пациент 1 Patient 1	6 мес. 6 months	c.1058_1061delCACC	–
Пациент 2 Patient 2	1 год 6 мес. 1 year 6 months	c.775delG	–
Пациент 3 Patient 3	1 год 9 мес. 1 year 9 months	c.121C > T	–

Fucus Vesiculosus, АДФ, EGTA, HEPES, бычий сывороточный альбумин, апираза (степень очистки VII), TRAP-6 (*Sigma-Aldrich, St Louis, Миссури, США*); NaCl; Na₂HPO₄; KCl; NaHCO₃; MgCl₂; CaCl₂ (Агат-Мед, Москва, Россия).

Кровь здоровых доноров и пациентов с СВО забирали из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие гирудин (*Sarstedt Monovette*®). Кровь была окрашена кальций-чувствительным флуорофором *Fura-Red* в концентрации 2 мкМ в присутствии 0,1 ед/мл апиразы в течение 35 мин при 37°C. По истечении 35 мин отбирали богатую тромбоцитами плазму, образованную при осаждении эритроцитов, и разводили буфером Тирода (134 мМ NaCl; 0,34 мМ Na₂HPO₄; 2,9 мМ KCl; 12 мМ NaHCO₃; 20 мМ HEPES; 5 мМ глюкозы; 1 мМ MgCl₂; 2 мМ CaCl₂; БСА 2% по массе; pH 7,3) до концентрации тромбоцитов 1 × 10³ в мл.

Исследование проведено посредством проточного цитометра BD FACS *Canto II*. К пробам добавляли флуоресцентно-меченный фибриноген человека в концентрации 100 мкг/мл. После этого пробы анализировали в кинетическом режиме. Через 60 сек от начала исследования к пробам добавляли активаторы (2 мкМ АДФ; 2,5 мкМ TRAP-6; 5 мкг/мл CRP; 100 мкг/мл фукоидан). Для пересчета флуоресценции *Fura-Red* в концентрации кальция последовательно добавляли 1 мкМ иономицина и 10 мМ EGTA. Пересчет производили по формуле Гринкевича [22]. Дополнительно проводили нормировку на теоретически рассчитанную концентрацию кальция в присутствии 10 мМ EGTA на основе [23]. Связывание фибриногена считали максимальным после инкубации пробы с 1 мкМ иономицина в течение 3 мин.

Статистический анализ результатов проточной цитометрии выполнен с применением *Python 3.7*. Для оценки статистической значимости использовали критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характерная особенность тромбоцитов у пациентов с СВО – меньший их размер по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров [14]. С помощью метода проточной цитометрии подтверждено, что тромбоциты пациентов с СВО обладают меньшим прямым светорассеянием (FSC, *рисунок 1 А*), чем тромбоциты здоровых доноров (*рисунок 1 Б*). При активации тромбоцитов происходит изменение их формы с дискоидной на сферическую, что приводит к уменьшению бокового светорассеяния на проточном цитометре. Данное явление наблюдалось и при исследовании тромбоцитов пациента с СВО (*рисунок 2 В*), и тромбоцитов здорового донора (*рисунок 2 Г*). Было также показано, что относительное изменение формы тромбоцитов пациентов с СВО при активации всеми агонистами происходило сильнее, чем у тромбоцитов здоровых доноров (*таблица 2*).

Определение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича. В покоящихся тромбоцитах здоровых доноров концентрация кальция постоянна и редко превышает 20 нМ (*рисунок 2 Б*). Однако при активации в тромбоцитах начинается кальциевый спайкинг – кратковременное многократное увеличение концентрации кальция в несколько раз, вплоть до 1 мкМ в максимуме, с последующей релаксацией до базового уровня. Кальциевые спайки хорошо наблюдаемы в экспериментах по микроскопии отдельных тромбоцитов [24]. Однако при анализе суспензии тромбоцитов с помощью проточной цитометрии происходит усреднение спайков по времени, что приводит к наблюдаемому постепенному увеличению концентрации кальция в целом по суспензии.

Сравнение концентрации кальция в цитозоле тромбоцитов пациентов с СВО (*рисунок 2 А*) и тромбоцитах здоровых доноров (*рисунок 2 Б*) показало, что в покое концентрация кальция в тромбоцитах пациента составляет 35–65 нМ; у здоровых доноров – 5–15 нМ, то есть в 2–4 раза выше. Мы обнаружили также, что после перемешивания в результате пипетирования концентрация кальция в тромбоцитах пациентов возрастает с последующим снижением до базового уровня, а в тромбоцитах здоровых доноров сохраняет стабильность вне зависимости от перемешивания (*рисунок 2 А, Б*).

Максимальная концентрация свободных ионов кальция и максимальное связывание фибриногена совпадают у тромбоцитов здоровых доноров и пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича. Качественное (*рисунок 2*) и количественное (*рисунок 3*) сравнение изменения концентрации кальция и связывания фибриногена тромбоцитами пациентов с СВО

Рисунок 1

Сравнение размера (FSC) и формы (SSC) тромбоцитов пациента с синдромом Вискотта–Олдрича и здорового донора: тромбоцитарная область зависимости бокового светорассеяния (SSC) от прямого светорассеяния на точечных диаграммах (FSC, указано напряжение на детекторах) для пациента (А) и здорового донора (Б); изменение бокового светорассеяния (SSC-H) при активации тромбоцитов пациента (В) и здорового донора (Г)

Figure 1

Comparison of the size (FSC) and shape (SSC) of platelets of WAS patients and platelets of healthy donors: platelet area on the dotplots of side scattering (SSC) vs forward scattering (FSC, detector voltages are given) for WAS patient (A) and healthy donors (B); change of the side scattering (SSC-H) upon activation of platelets of patients (B) and healthy donors (Г)

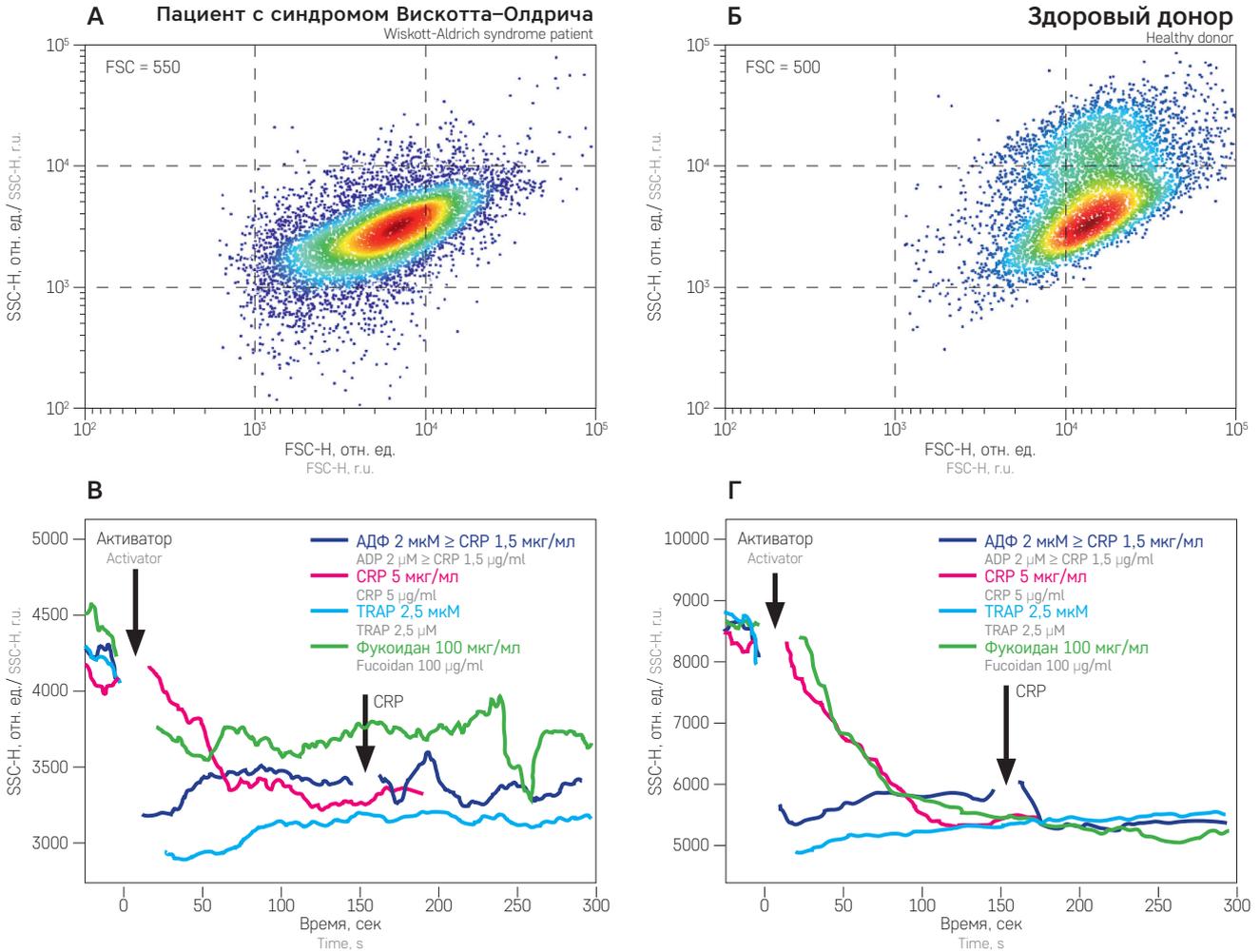


Таблица 2

Количественное значение характеристик активации тромбоцитов (выделены статистически значимо различающиеся результаты; $p < 0,01$)

Table 2

Averaged values of the platelet activation parameters (significantly different values are given in bold; $p < 0.01$)

Активатор Activator	WAS WAS			Здоровые доноры Healthy donors		
	Кальций, нМ Calcium, nM	Фибриноген, отн. ед. Fibrinogen, r.u.	Изменение формы, % SSC Change, %	Кальций, нМ Calcium, nM	Фибриноген, отн. ед. Fibrinogen, r.u.	Изменение формы, % SSC Change, %
Покой Resting	56 ± 17	–	–	9 ± 6	–	–
Некор. АДФ Non-dyed ADP	–	17 ± 4	63 ± 7	–	20 ± 2	49 ± 6
АДФ ADP	117 ± 12	17 ± 4	67 ± 7	97 ± 26	15 ± 6	48 ± 3
TRAP-6 TRAP-6	165 ± 15	19 ± 4	67 ± 17	208 ± 40	16 ± 5	46 ± 9
CRP CRP	75 ± 15	7 ± 3	60 ± 3	77 ± 45	8 ± 4	40 ± 6
Фукоидан Fucoidan	–	5 ± 1	63 ± 4	–	9 ± 5	46 ± 7

Рисунок 2

Качественное сравнение активации тромбоцитов пациента с синдромом Вискотта–Олдрича и здорового донора: зависимость концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов пациента (А) и здорового донора (Б) при активации; связывание фибриногена тромбоцитами пациента (В) и здорового донора (Г) при активации; Д – изменение концентрации свободных ионов кальция (сплошные линии) и связывание фибриногена (пунктир) тромбоцитами пациента (синяя линия) и здорового донора (красная линия) при последовательной активации фукоиданом и АДФ с интервалом в 5 мин

Figure 2

Qualitative comparison of the activation of platelets of Wiskott-Aldrich patients and healthy donors (A, Б) – dynamics of free calcium ions concentration in the platelet cytosol of WAS patients (A) and healthy donors (Б) upon activation. (B, Г) – fibrinogen binding by platelets of patient (B) and healthy donor (Г) upon activation; Д – cytosolic calcium concentration (solid lines) and fibrinogen binding (dotted lines) by platelets of WAS patients (black) and healthy donor (red) upon sequential activation by fucoidan and ADP delayed by 5 minutes

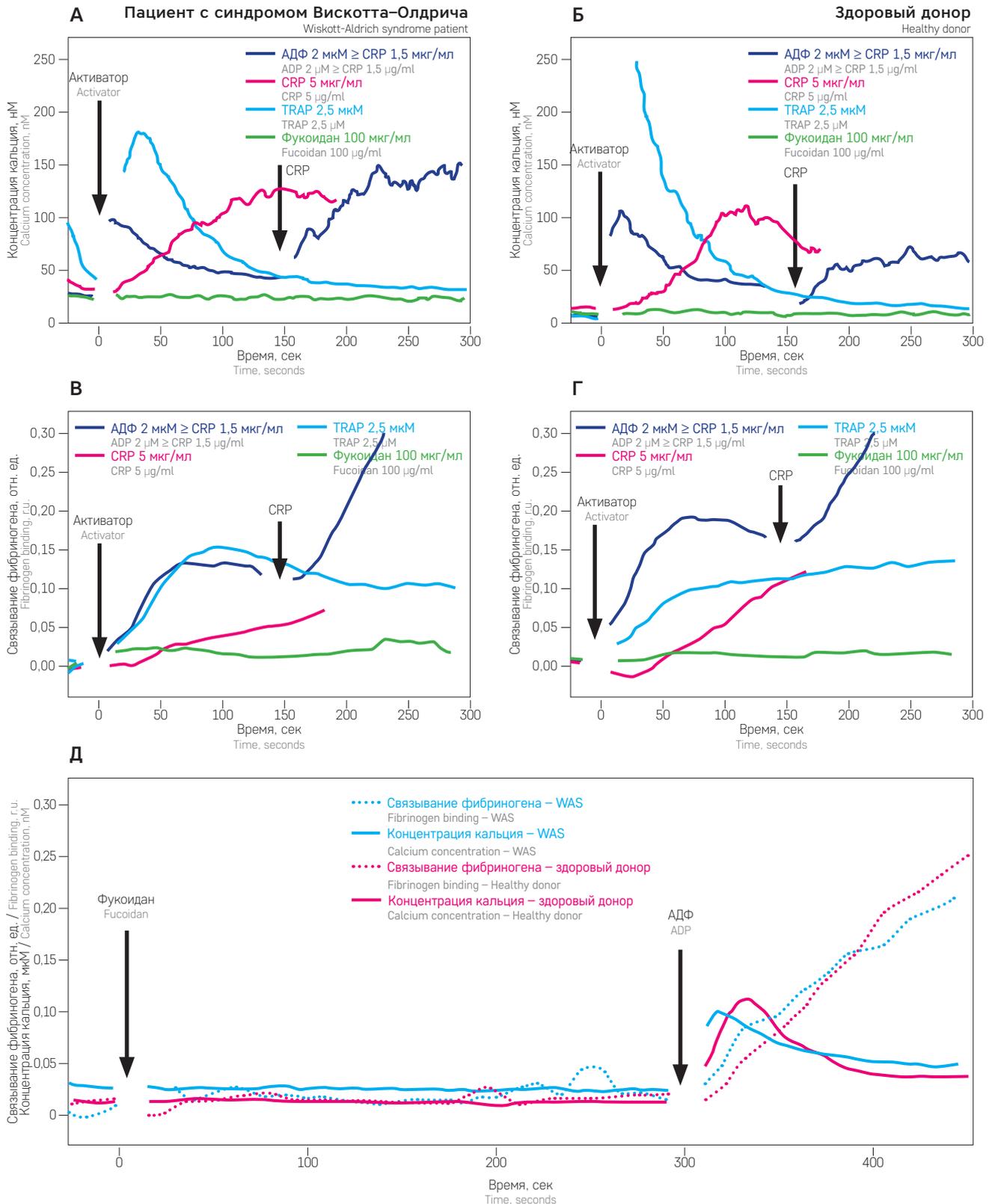
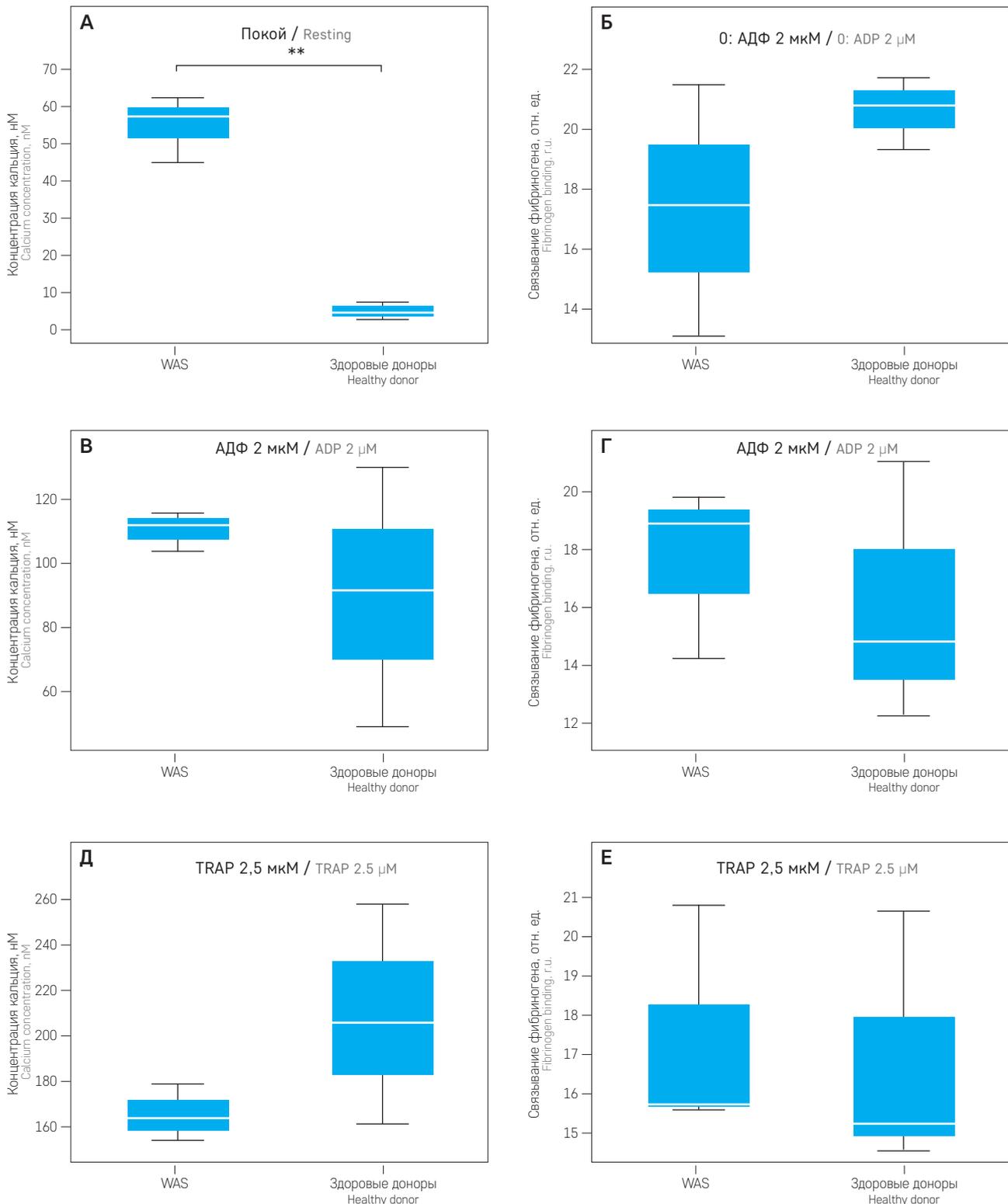


Рисунок 3

Количественное сравнение маркеров активации тромбоцитов пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича и здоровых доноров: **А** – концентрация кальция в поющих тромбоцитах; **Б** – связывание фибриногена неокрашенными тромбоцитами при стимуляции 2 мкМ АДФ; максимально достижимая концентрация свободных ионов кальция (**В**) и максимальное связывание фибриногена (**Г**) при стимуляции 2 мкМ АДФ окрашенных *Fura-Red* тромбоцитов (Г); максимально достижимая концентрация свободных ионов кальция (**Д**) и максимальное связывание фибриногена (**Е**) при стимуляции 2,5 мкМ TRAP окрашенных *Fura-Red* тромбоцитов (исследованы 3 пациента и 3 здоровых донора)

Figure 3

Quantitative comparison of the platelet activation parameters of WAS patients and healthy donors: **A** – cytosolic calcium concentration in the resting platelets; **Б** – fibrinogen binding by non-dyed platelets upon stimulation by ADP 2 μM ; **В, Г** – maximally achieved concentration of free calcium ions (**В**) and maximally achieved fibrinogen binding (**Г**) of *Fura-Red* loaded platelets upon activation by 2 μM of ADP; **Д, Е** – maximally achieved concentration of free calcium ions (**Д**) and maximally achieved fibrinogen binding (**Е**) of *Fura-Red* loaded platelets upon activation by 2.5 μM of TRAP (3 patients and 3 healthy donors were included in the study)



показало, что, несмотря на увеличенную концентрацию кальция в покое (*рисунок 3 А*), при активации всеми видами активаторов максимальные концентрации кальция совпадают с таковыми у здоровых доноров (*рисунок 3 В, Д*). Было также отмечено, что связывание фибриногена при качественной и количественной оценках не отличается (*рисунки 2 В, Г и 3 Б, Г, Д*). Получено сходство и при последовательной активации CRP через 150 сек после стимуляции АДФ (*рисунок 2 А–Г*), индуцирующим различные ветви сигнализации в тромбоцитах (CRP индуцирует тирозинкиназную сигнализацию, АДФ – GPCR-сигнализацию), а также АДФ через 300 сек после активации фукоиданом, запускающим тирозинкиназную сигнализацию (*рисунок 2 Д*). Количественное сравнение характеристик активации тромбоцитов пациентов и здоровых доноров представлено в *таблице 2*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование внутриклеточной сигнализации и функциональной активности тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича было направлено как на выявление патофизиологических механизмов заболевания, так и на определение характерных черт, важных для диагностики данного заболевания. Методом проточной цитометрии проведен анализ внутриклеточной кальциевой сигнализации, а также изменения формы тромбоцитов и связывания фибриногена тромбоцитами у пациентов с СВ0 и здоровых доноров при активации различными агонистами.

Нами было показано, что для тромбоцитов пациентов с СВ0 характерна повышенная цитозольная концентрация кальция в состоянии покоя (см. *рисунки 2, 3, таблицу 2*). Это хорошо согласуется с данными опубликованного исследования [10]. С другой стороны, максимально достижимые концентрации кальция в ответ на индукторы как G-белковой, так и тирозинкиназной сигнализации не отличаются достоверно от таковых у здоровых доноров (см. *рисунок 3, таблицу 2*), что также согласуется с ранее опубликованными исследованиями [10], где использовалась стимуляция TRAP (активация ассоциированного с G-белком рецептора к тромбину PAR1). Данные по стимуляции аналогом коллагена (активация рецептора GPVI, задействующего тирозинкиназную сигнализацию) позволяют предположить, что концентрация кальция у пациентов с СВ0 нарастает быстрее, чем у здоровых доноров.

Уменьшенный объем тромбоцитов у пациентов с СВ0 может быть одной из причин повышенной концентрации кальция в состоянии покоя по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров [6]. С другой стороны, более сильное изменение формы тромбоцитов у пациентов с синдромом Вискотта–

Олдрича может потенциально компенсировать изначальное различие в размерах. Данный результат, возможно, объясняет сходство максимально достижимых концентраций кальция при активации тромбоцитов пациентов и здоровых доноров, но для установления природы этого явления необходимы дополнительные исследования.

Известно, что, несмотря на уменьшенный размер, количество ключевых сигнальных и цитоскелетных белков в тромбоцитах пациентов с СВ0 и здоровых доноров совпадает [14]. Более сильное изменение формы тромбоцитов у пациентов может быть обусловлено большим значением отношения площади мембраны к объему цитозоля для тромбоцитов пациентов, предсказанным посредством компьютерного моделирования в ранее опубликованных работах [14]. Большее отношение площади мембраны к объему тромбоцита также предполагает усложненную открытую канальцевую систему.

Увеличение площади мембраны может быть одним из следствий нарушенного механизма тромбопоэза у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича, в частности, нарушения процесса отшнуровывания протромбоцитов от мегакариоцитов, при котором важную роль выполняет белок WASp [25]. С другой стороны, измененное отношение площади мембраны к объему [14] может приводить к нестабильности открытой канальцевой системы тромбоцитов, что, в свою очередь, ведет к повышенной чувствительности тромбоцитов к сдвиговым стрессам и, возможно, их быстрой гибели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышенная концентрация кальция, а также более значимое изменение формы тромбоцитов при активации – характерные проявления синдрома Вискотта–Олдрича, которые можно использовать как дополнительные лабораторные маркеры при диагностике СВ0.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана стипендией Президента РФ СП-2675.2019.4, грантом Фонда поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – детям», грантами РФФИ 17-00-00141 (17-00-00140/17-00-00138) и 18-34-20026.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Martyanov A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0211-6325>
Morozova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1443-4902>
Khoreva A.L. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7684-9188>
Panteleev M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>
Shcherbina A.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3113-4939>
Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Литература

- Candotti F. Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott–Aldrich Syndrome. *J Clin Immunol* 2018; 38 (1): 13–27.
- Perry G.S. 3rd, Spector B.D., Schuman L.M., Mandel J.S., Anderson V.E., McHugh R.B., et al. The Wiskott–Aldrich syndrome in the United States and Canada (1892–1979). *J Pediatr* 1980; 97: 72–8.
- Moratto D., Giliani S., Notarangelo L.D., Mazza C., Mazzolari E., Notarangelo L.D. The Wiskott–Aldrich syndrome: from genotype–phenotype correlation to treatment. *Expert Rev. Clin Immunol* 2007; 3: 813–24.
- Rivers E., Thrasher A.J. Wiskott–Aldrich syndrome protein: Emerging mechanisms in immunity. *Eur J Immunol* 2017; 47: 1857–66.
- Taylor M.D., Sadhukhan S., Kottangada P., Ramgopal A., Sarkar K., D’Silva S., et al. Nuclear Role of WASp in the Pathogenesis of Dysregulated TH1 Immunity in Human Wiskott–Aldrich Syndrome. *Sci Transl Med* 2010; 2: 37ra44 LP-37ra44.
- Patel P.D., Samanich J.M., Mitchell W.B., Manwani D. A unique presentation of Wiskott–Aldrich syndrome in relation to platelet size. *Pediatr. Blood Cancer* 2011; 56: 1127–9.
- Ochs H.D., Slichter S.J., Harker L.A., Von Behrens W.E., Clark R.A., Wedgwood R.J. The Wiskott–Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* 1980; 55: 243–52.
- Haddad E., Cramer E., Riviere C., Rambeau P., Louache F., Guichard J., et al. The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood* 1999; 94: 509–18.
- Prislovsky A., Zeng X., Sokolic R.A., Garabedian E.N., Anur P., Candotti F., Strom T.S. Platelets from WAS patients show an increased susceptibility to ex vivo phagocytosis. *Platelets* 2013; 24: 288–96.
- Shcherbina A., Rosen F.S., Remold-O’Donnell E. Pathological events in platelets of Wiskott–Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol* 1999; 106: 875–83.
- Mahlaoui N., Pellier I., Mignot C., Jais J.-P., Bilhou-Nabera C., Moshous D., et al. Characteristics and outcome of early-onset, severe forms of Wiskott–Aldrich syndrome. *Blood* 2013; 121: 1510–6.
- Sandrock K., Zieger B. Current Strategies in Diagnosis of Inherited Storage Pool Defects. *Transfus Med Hemother* 2010; 37: 248–58.
- 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* 2019; 30 (4): 428–37.
- Obydennyi S.I., Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Ignatova A.A., Varlamova T.V., Gambaryan S., et al. Mechanisms of increased mitochondria-dependent necrosis in Wiskott–Aldrich syndrome platelets. *Haematologica* 2019. DOI: 10.3324/haematol.2018.214460 [Epub ahead of print].
- Medina S.S., Siqueira L.H., Colella M.P., Yamaguti-Hayakawa G.G., Duarte B.K.L., Dos Santos Vilela M.M., Ozelo M.C. Intermittent low platelet counts hampering diagnosis of X-linked thrombocytopenia in children: report of two unrelated cases and a novel mutation in the gene coding for the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *BMC Pediatr* 2017; 17: 151.
- Sokolic R., Oden N., Candotti F. Assessment of Immature Platelet Fraction in the Diagnosis of Wiskott–Aldrich Syndrome. *Front Pediatr* 2015; 3: 49.
- Obydennyi S.I., Sveshnikova A.N., Ataulkhanov F.I., Pantelev M.A. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 1867–81.
- Fischer A. Platelets are the Achilles’ heel of Wiskott–Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 144: 668–70.
- Kwan A., Abraham R.S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J.K., et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA* 2014; 312: 729–38.
- Chiang S. Screening for Wiskott–Aldrich syndrome by flow cytometry. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142: 333–5.
- Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., et al. Systems biology insights into the meaning of the platelet’s dual-receptor thrombin signaling. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 2045–57.
- Grynkiwicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440–50.
- Schoenmakers T.J., Visser G.J., Flik G., Theuvsen A.P. CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques* 1992; 12: 870–9.
- Heemskerk J.W.M., Hoyland J., Masant W.T., Sage S. Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets. *Biochem J* 1992; 283: 379–83.
- Poulter N.S., Pollitt A.Y., Davies A., Malinova D., Nash G.B., Hannon M.J., et al. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott–Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nat Commun* 2015; 6: 7254.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 24.12.2019
Принята к печати 29.01.2020

Контактная информация:
Швец Оксана Анатольевна,
канд. мед. наук, врач – аллерголог-иммунолог НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: shv1808@rambler.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-108-115

Лимфаденопатия по типу болезни Розаи–Дорфмана у пациента с синдромом Вискотта–Олдрича: сложности диагностики

О.А. Швец, Д.С. Абрамов, А.Л. Хорева, Д.Е. Першин, А.М. Киева, А.В. Пшонкин

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

Синдром Вискотта–Олдрича (СВО) – первичное иммунодефицитное состояние (ПИДС), характеризующееся типичными симптомами разной степени тяжести: тромбоцитопения, инфекция, иммунная дисрегуляция и склонность к онкологическим заболеваниям. В связи с этим при любом лимфопролиферативном состоянии при СВО необходима биопсия лимфоузлов. Однако трактовка гистологической картины требует знания особенностей патоморфологии лимфоузлов у пациентов с иммунодефицитом и нередко представляет сложности. В данной статье представлено клиническое наблюдение с описанием редкого сочетания поздно диагностированного СВО с лимфаденопатией, клинически и морфологически напоминающей болезнь Розаи–Дорфмана в контексте ПИДС. Родители дали согласие на использование информации, в том числе фото ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: болезнь Розаи–Дорфмана, гистология, синдром Вискотта–Олдрича, лимфопролиферативный синдром

Швец О.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 108–115.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-108-115

Rosai–Dorfman – like lymphadenopathy in a patient with Wiskott–Aldrich syndrome: diagnostic difficulties

O.A. Shvets, D.S. Abramov, A.L. Khoreva, D.E. Pershin, A.M. Kievina, A.V. Phonkin

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

Wiskott–Aldrich Syndrome (WAS) is a primary immunodeficiency (PID), characterized by varying severity of typical symptoms: thrombocytopenia, infections, immune dysregulation and cancer predisposition. Therefore any lymphoproliferative complications in WAS patients require lymph node biopsy. However, the interpretation of the histological picture is often complicated and requires the knowledge of the lymph node pathomorphology in patients with immunodeficiency. This article describes a rare combination of late diagnosis of WAS complicated by lymphadenopathy, which clinically and morphologically resembles Rosai–Dorfman disease (RDD). Parents gave their consent to use information about the child, including the photos, in the article.

Key words: Rosai–Dorfman disease, histology, Wiskott–Aldrich syndrome, lymphoproliferative syndrome

Shvets O.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 108–115.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-108-115

Синдром Вискотта–Олдрича (СВО) – это первичное иммунодефицитное состояние (ПИДС), наблюдающееся преимущественно у пациентов мужского пола, вызванное гемизиготными мутациями в гене *WAS*, расположенном на X-хромосоме [1, 2]. Многогранность клинических проявлений СВО объясняется тем, что белок WASP, функция которого страдает у пациентов с СВО, является критическим регулятором цитоскелета и экспрессируется во всех гематопозитических клеточных линиях [3–5]. Классическая клиническая картина включает экзему, комбинированный иммунодефицит, тромбоцитопению [6]. Однако для СВО характерна разная степень выраженности проявлений – от изолированной тромбоцитопении до тяжелого состояния с выраженным иммунодефицитом

и геморрагическим синдромом [7, 8]. Ранее СВО классифицировали в соответствии с тяжестью заболевания – классический или X-сцепленная тромбоцитопения. Для оценки выраженности клинических проявлений была разработана шкала тяжести [9]: 3–5 баллов имеют пациенты с «классическим» СВО. С развитием новых методов лабораторной и молекулярно-генетической диагностики появилась возможность выявлять СВО в первые месяцы жизни ребенка. Тем не менее надежного биомаркера для прогнозирования тяжести течения этого заболевания не существует. К тому же выраженность проявлений СВО в раннем детстве имеет ограниченное значение для принятия решений о дальнейшей тактике, ведь осложнения могут развиваться в любом возрасте, в том числе у пациентов с легким течением [10].

Осложнения при СВО представлены аутоиммунными проявлениями, доброкачественными и злокачественными лимфопролиферативными состояниями, в том числе лимфоретикулярными опухолями [11, 12]. Предполагается, что генез лимфопролиферации определяется непосредственно дефектом иммунной системы и проистекает из качественных и количественных отклонений Т- и В-клеток [13]. Риск развития злокачественных заболеваний, увеличивающийся с возрастом, у пациентов с СВО превышает общепопуляционный практически в 100 раз [14].

Приблизительно две трети опухолей представлены неходжкинскими лимфомами, часто экстранодальными [15]; одну треть составляют преимущественно острые миелоидные лейкозы и болезнь Ходжкина [16]. Данные состояния достаточно хорошо описаны в литературе, чего нельзя сказать о доброкачественной лимфопролиферации. Сложность гистологической диагностики лимфопролиферативных состояний при ПИДС, в частности при СВО, обусловлена тем фактом, что иммунологические нарушения обуславливают морфологические особенности непораженных лимфоузлов. Ранее у пациентов с СВО были описаны следующие гистологические особенности строения лимфатических узлов:

- истощение Т-клеточной зоны и наличие герминальных центров [17, 18] при прогрессивной потере Т-клеток и относительно интактных В-клетках [17, 19, 20];
- прогрессивная потеря герминальных центров и повышенное содержание плазматических клеток, вероятно, как следствие гиперактивности В-клеточной системы из-за рецидивирующих инфекций, гиперкатаболизма иммуноглобулинов [21], недостатка супрессорной Т-клеточной функции или комбинации этих трех факторов; в некоторых случаях преобладали большие эпителиоидные клетки, формирующие гранулемы [22];
- присутствие атипичных плазматических клеток [23] с неясным значением;
- экстрамедулярный гематопоз [22];
- эозинофилия при наличии периферической эозинофилии, фокальный фиброз, избыток трансформированных лимфоцитов [22];
- расширенные синусы с рассеянными лимфоидными клетками и гистиоцитами [22];
- гемофагоцитоз и секвестрация эритроцитов при положительной прямой пробе Кумбса с аутоиммунной гемолитической анемией [24, 25] и при вирус-ассоциированном процессе [26]; наличие эритроцитов в фагоцитарных клетках, в некоторых случаях с присутствием лимфоцитов [22];
- выраженная гиперплазия ретикулярных клеток [17, 18], которую связывали с коллапсом стромального каркаса, следующим за потерей Т-клеток.

Среди различных доброкачественных лимфопролиферативных состояний у пациентов с СВО описаны два случая болезни Розаи–Дорфмана (БРД), или синусового гистиоцитоза, с массивной лимфаденопатией (СГМЛ) нодальной локализации [27]. Первый пациент в возрасте 6 лет развил СГМЛ с поражением шейных и медиастинальных лимфатических узлов, а через 8 мес. погиб вследствие иммунобластной лимфомы с вовлечением центральной нервной системы. Вторым пациентом в возрасте 5 лет страдал от рецидивирующей стрептококковой инфекции кожи с увеличением паховых лимфатических узлов, биопсия которых выявила СГМЛ. У обоих пациентов были родственники мужского пола с СВО, не имеющие осложнений в виде СГМЛ.

Болезнь Розаи–Дорфмана представляет собой редкий не лангерганс-клеточный гистиоцитоз [28]. В оригинальном описании этого заболевания в 1969 году *J. Rosai* и *R. Dorfman* представили четырех пациентов с массивной шейной лимфаденопатией. Их состояние они охарактеризовали как «синусовый гистиоцитоз с массивной лимфаденопатией» [29]. В дальнейшем были описаны как узловые, так и экстранодальные проявления болезни [30]. БРД – редкое, гетерогенное и, к сожалению, недостаточно хорошо изученное заболевание. Остается открытым вопрос и о его классификации как опухолевого либо доброкачественного расстройства. Ранее была показана поликлональность данного заболевания [31], но недавние сообщения демонстрируют у ряда пациентов нарушения пути MAP-ERK [32], что позволяет предположить неопластическую природу и связь с другими гистиоцитарными заболеваниями [28]. В 43% случаев БРД типичные патологические изменения выявляют экстранодально, такая локализация часто связана с плохим прогнозом и непрерывно рецидивирующим течением [33].

Клинические проявления БРД включают безболезненное, а в ряде случаев болезненное увеличение лимфатических узлов или мягких тканей вне лимфоузлов, иногда с наличием В-симптомов (лихорадка, потеря массы тела, ночные поты), лейкоцитоза, гипергаммаглобулинемии, умеренной воспалительной активности [28, 33, 34]. БРД может ассоциироваться с иммунодефицитными, лимфопролиферативными и аутоиммунными заболеваниями. Предполагается, что в развитие данной патологии внесли свой вклад соматические мутации в генах *KMT2D*, *PLCG2*, выявленные в ткани опухоли пациентов с БРД [34], которые в случае герминальных поражений могли бы привести к первичному дефекту иммунной системы. Описания БРД непосредственно у пациентов с ПИДС относятся преимущественно к аутоиммунному лимфопролиферативному синдрому (АЛПС) [35–38].

Для определения объема поражения при БРД хорошо зарекомендовала себя позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ-КТ) с фтордезоксиглюкозой (18F-ФДГ) в связи с повышенной зависимостью пролиферирующих гистиоцитов от глюкозы [39].

Окончательный диагноз "БРД" основывается на гистопатологическом и иммуногистохимических исследованиях биоптатов пораженных тканей, которые демонстрируют эмпериполез, интенсивную инфильтрацию гистиоцитов, негативных по CD1a, с экспрессией S-100 и CD68 [28].

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Родители дали согласие на использование информации, в том числе фото ребенка, в научных исследованиях и публикациях. Мальчик А., 14 лет, поступил в стационар кратковременного лечения НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (далее – НМИЦ ДГОИ) в связи с лимфопролиферативным синдромом в виде видимого увеличения (конгломерата) переднешейных и надключичных лимфатических узлов, проявлениями геморрагического синдрома по типу сливных экхимозов и гематом симметрично в области голеностопных суставов и стоп.

Из анамнеза известно, что пациент рожден от первой физиологической беременности, первых срочных самостоятельных родов, с нормальными антропометрическими показателями. На первом году жизни ребенок находился на грудном вскармливании, у него отмечали легкие проявления атопического дерматита. Мальчик редко болел вирусными инфекциями; среди гнойных инфекционных эпизодов можно выделить только случай двустороннего перфоративного отита в возрасте 4,5 года и панариций III пальца левой кисти в 8,5 года. Умеренное увеличение поднижнечелюстных лимфатических узлов зафиксировано в возрасте 6,5 года. Геморрагический синдром не беспокоил пациента до 8-летнего возраста, при этом, по данным амбулаторной карты, в представленных результатах клинического анализа крови устойчиво отмечались характерные для СВО изменения: низкие показатели числа тромбоцитов (7–23 тыс./мкл) и их объема (MPV – 5–5,1 фл; N 7,8–11). Первые проявления геморрагического синдрома наблюдались в виде экхимозов, через 2 мес. присоединилось некупируемое носовое кровотечение на фоне содержания тромбоцитов 25 тыс./мкл. Состояние было расценено как иммунная тромбоцитопения. На тот момент наблюдалась также дисгаммаглобулинемия: IgA – 1 г/л нормы; IgG – 4,8 г/л; IgM – 0,3 г/л. Была проведена костномозговая пункция – гемобластоз исключен.

Ребенок получил иммуносупрессивную терапию (преднизолон – 1–2 мг/кг/сут) – без гематоло-

гического ответа (содержание тромбоцитов не увеличилось). Позднее периодически отмечался геморрагический синдром, сохранялась тромбоцитопения в диапазоне от 22–146 тыс./мкл. С возраста 13,5 года стал нарастать лимфопролиферативный синдром: по данным УЗИ отмечено увеличение лимфоузлов шеи, подбородочной области, постепенное нарастание их размеров до видимого увеличения. Кроме того, сохранялась тромбоцитопения (9 тыс./мкл) с геморрагическим синдромом в виде экхимозов, без гематологического ответа на внутривенные иммуноглобулины (ВВИГ) в дозе 1 г/кг.

В возрасте 14 лет пациенту впервые провели расширенное иммунологическое обследование: зафиксирована CD4-лимфопения (0,2 тыс./мкл), повышение NK-клеток до 44% (0,8 тыс./мкл), а также изолированное снижение IgM сыворотки (0,29 г/л). При дальнейшем обследовании не получено данных за туберкулез, ВИЧ; исключен аутоиммунный лимфопролиферативный синдром: нормальное содержание цианкобаламина в крови (201 пг/мл); отсутствие повышения TCRabCD3⁺CD4⁺CD8⁻ (< 1% в CD3⁺ популяции). Проведена биопсия лимфатического узла надключичной области: морфологические признаки соответствовали хроническому гранулематозному лимфадениту.

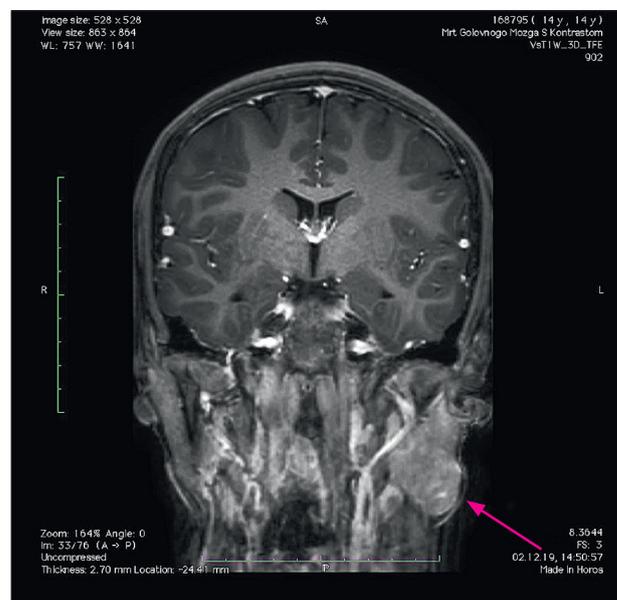
При поступлении пациента в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России определялась лимфаденопатия, наиболее выраженная слева: подчелюстные, переднешейные, надключичные лимфоузлы – до 3 см, сливающиеся в конгломераты, подмышечные лимфоузлы – до 3 см (рисунок 1).

Рисунок 1

MPT головы пациента А.: красной стрелкой отмечен конгломерат увеличенных лимфатических узлов

Figure 1

MRI of the head of patient A.: the red arrow indicates a conglomerate of enlarged lymph nodes



Таблица

Основные гематологические и иммунологические показатели пациента А.

Table

Main laboratory findings of patient A.

Основные гематологические показатели Complete blood count	Результат Result	Норма Normal range
Лейкоциты, 10 ⁹ /л WBC, 10 ⁹ /l	12,53	6,05–9,85
Гранулоциты, 10 ⁹ /л Granulocytes, 10 ⁹ /l	10,4	1,5–8,5
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /l	0,5	1,5–7
Эозинофилы, 10 ⁹ /л Eosinophils, 10 ⁹ /l	0,25	0,06–0,5
Моноциты, 10 ⁹ /л Monocytes, 10 ⁹ /l	1,38	0,09–0,6
Тромбоциты, 10 ⁹ /л PLT, 10 ⁹ /l	27	204–356
Средний объем тромбоцита (MPV), фл MPV, fl	8	9–13
Эритроциты, 10 ¹² /л RBC, 10 ¹² /l	5,26	4,2–4,6
Гемоглобин, г/л Hb, g/l	123	115–138
Ретикулоциты, ‰ Rt, ‰	41	2–12
СОЭ, мм/ч ESR, mm/h	40	2–10
ИФТ лимфоцитов крови Immune cells assay	Результат Result	Норма Normal range
Лимфоциты (LYM), 10 ⁶ /мл Lymphocytes (LYM), 10 ⁶ /ml	0,96	1,2–3
CD3 (Т-лимфоциты) от LYM, % CD3 (T- lymphocytes) from LYM, %	56	66–76
CD3 (Т-лимфоциты), 10 ⁶ /мл CD3 (T- lymphocytes), 10 ⁶ /ml	0,54	1,4–2
CD3/4 (Т-хелперы) от CD3+, % CD3/4 (T-helper) from CD3+, %	16	33–41
CD3/4 (Т-хелперы), 10 ⁶ /мл CD3/4 (T-helper), 10 ⁶ /ml	0,15	0,7–1,1
CD3/8 (Т-цитотокс.) от CD3+, % CD3/8 (T-cytolytic) from CD3+, %	37	27–35
CD3/8 (Т-цитотокс.), 10 ⁶ /мл CD3/8 (T- cytolytic), 10 ⁶ /ml	0,36	0,6–0,9
CD19 (В-лимфоциты) от LYM, % CD19 (B- lymphocytes) from LYM, %	9	12–22
CD19 (В-лимфоциты), 10 ⁶ /мл CD19 (B- lymphocytes), 10 ⁶ /ml	0,09	0,3–0,5
CD3-CD16+CD56+ (NK-клетки) от LYM, % CD3-CD16+CD56+ (NK-cells) from LYM, %	35	9,9–22,9
CD3-CD16+CD56+ (NK-клетки), 10 ⁶ /мл CD3-CD16+CD56+ (NK-cells), 10 ⁶ /ml	0,34	0,1–0,6
Иммуноглобулины сыворотки Serum immunoglobulins	Результат Result	Норма Normal range
Иммуноглобулин А, г/л IgA, g/l	1,21	1–2,3
Иммуноглобулин М, г/л IgM, g/l	0,19	0,6–2,6
Иммуноглобулин G, г/л Immunoglobulin G, g/l	8,83	7–16
Иммуноглобулин E, ед/мл IgE, u/ml	181	0–100

Лабораторно выявлена тромбоцитопения (минимально – $27 \times 10^9/\text{л}$), повышение СОЭ до 40 мм/ч, CRP – до 55 мг/л (без значимых очагов инфекции); положительная прямая проба Кумбса (1+); лимфопения с выраженным снижением CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ лимфоцитов в периферической крови; дисгаммаглобулинемия (таблица).

Исходя из данных анамнеза (длительно существующая тромбоцитопения со сниженным размером тромбоцитов) проведен анализ экспрессии белка WASP, которая оказалась резко снижена большей частью лимфоцитов (*Stain Index* = 0,84; $N > 6,8$). На основании этих данных выставлен диагноз ПИДС: СВО, в дальнейшем подтвержденный молекулярно-генетически (секвенирование по Сенгеру): выявлена дупликация с.442dupA в гемизиготном состоянии, приводящая к сдвигу рамки считывания и терминции трансляции через 21 кодон р.Arg148LysfsTer21 (R148Kfs*21). Выявленная дупликация описана в научной литературе как патогенная [40].

По совокупности клинико-лабораторных данных оценка по шкале тяжести СВО у данного пациента соответствовала 4 баллам.

Проведен комплекс обследований в связи с лимфопролиферативным синдромом (лимфаденопатия), в том числе ПЭТ-КТ с 18F-ФДГ: референсные зоны – печень ($SUV_{\max} = 2,2$), пул крови ($SUV_{\max} = 1,4$). Выявлено наиболее выраженное накопление радиофармпрепарата (РФП) лимфатическими узлами шеи слева – группы IB, IIA/B, III, IV, V и подключичными

Рисунок 2

ПЭТ-КТ с 18F-ФДГ: участки накопления радиофармпрепарата
Figure 2

PET/CT imaging: note areas of intense 18 F-FDG uptake



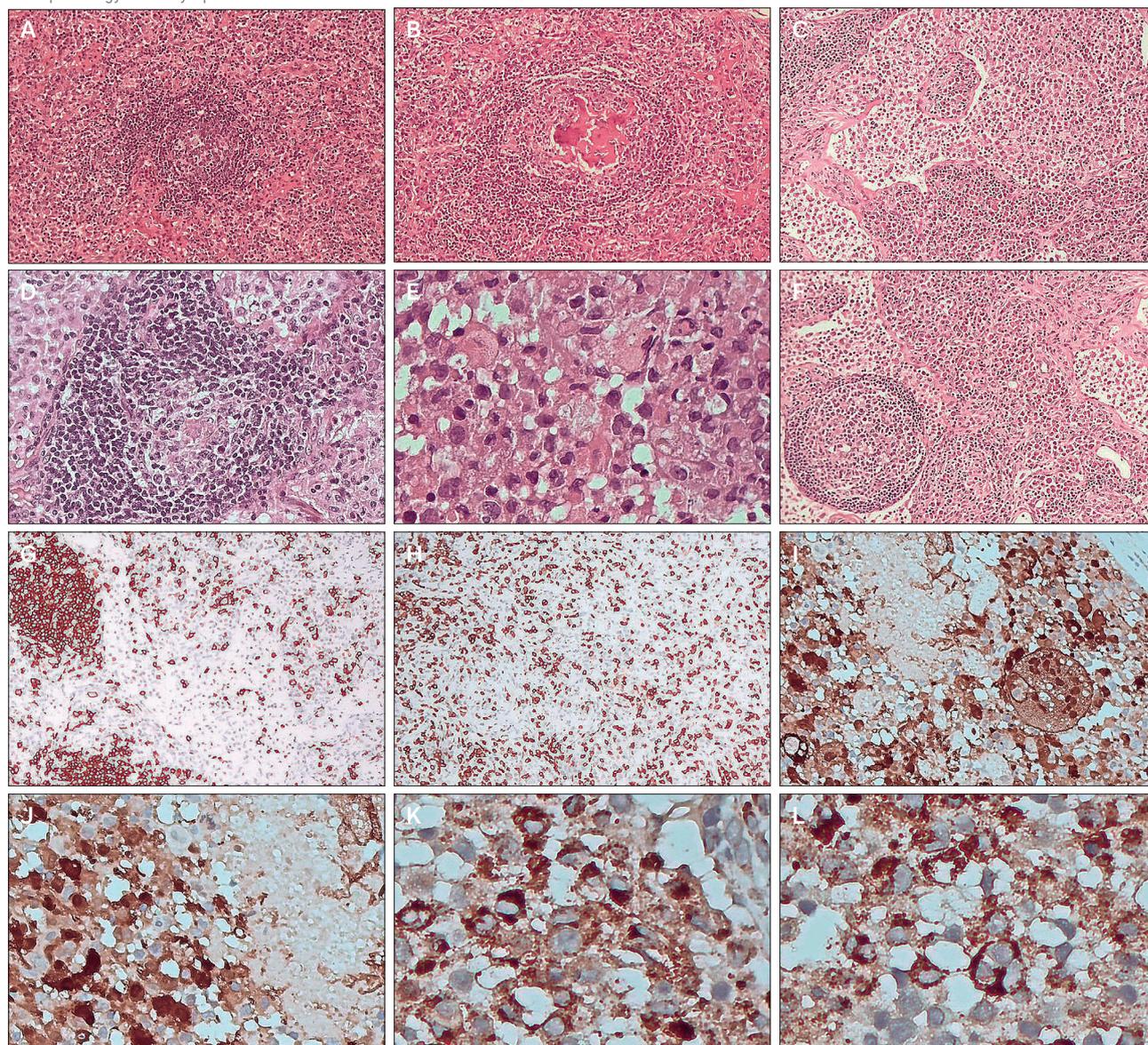
лимфатическими узлами с максимальным накоплением РФП в надключичной группе ($SUV_{max} = 7,7$), подмышечных ($SUV_{max} = 2,6$), подвздошных ($SUV_{max} = 2,3$) и паховых ($SUV_{max} = 1,6$) лимфатических узлах (рисунки 2). В связи с этим выполнена повторная диагностическая биопсия лимфатического узла, наиболее интенсивно накапливающего РФП, с хорошим оперативным доступом – в надключичной области.

Рисунок 3

Микроскопическая картина изменений ткани лимфатического узла

Figure 2

Micropathology of the lymph node



Ткань лимфатического узла с малым количеством лимфоцитов (A, ув. $\times 100$, ГиЭ) в виде резидуальных «затухающих», гиалинизированных лимфоидных фолликулов (B, ув. $\times 100$, ГиЭ) с парафолликулярным инфильтратом из гистиоцитов, эпителиоидных клеток, макрофагов. Синусы резко расширены, заполнены преимущественно гистиоцитами; есть признаки активного эритрофагоцитоза и эмпериополеза (C, D, E, F, ув. $\times 200$, ГиЭ). При ИГХ-исследовании выявлено резкое уменьшение количества CD20-позитивных В-лимфоцитов (G, ув. $\times 100$, ИHC, CD20) и CD3 (H, ув. $\times 100$, ИHC, CD3) позитивных Т-клеток; парафолликулярные инфильтраты состоят из большого количества S-100 позитивных гистиоцитов с признаками эмпериополеза (I, J, ув. $\times 200$, ИHC, S-100); гистиоцитарные элементы также позитивны CD68 (K, L, ув. $\times 200$, ИHC, CD68).

Notes: Lymph node tissue with a small number of lymphocytes (A, zoom $\times 100$, HE) in the form of residual "fading" hyalinized lymphoid follicles (B, zoom $\times 100$, HE) with parafollicular infiltrate from histiocytes, epithelioid cells, and macrophages. The sinuses are sharply widened, filled mostly with histiocytes, with signs of active erythrophagocytosis and emperipolesis (C, D, E, F, zoom $\times 200$, HE). An IHC study revealed a sharp decrease in the number of CD20 positive B-lymphocytes (G, zoom $\times 100$, IHC, CD20) and CD3 (H, zoom $\times 100$, IHC, CD3) of positive T cells, parafollicular infiltrates consist of a mass of S-100 positive histiocytes with signs of emperipolesis (I, J, zoom $\times 200$, IHC, S-100), histiocytic elements are also positive CD68 (K, L, zoom $\times 200$, IHC, CD68).

Обращает на себя внимание выраженное расширение синусов лимфатического узла, заполненное макрофагами и гистиоцитами с признаками эритрофагоцитоза и эмпериполеза (в цитоплазме макрофага определяются интактные лимфоциты). Таким образом, выявленные изменения – выраженная деплеция лимфоидной ткани за счет угнетения CD3 и CD20-позитивных лимфоцитов, расширение синусов и наличие гистиоцитарных и эпителиоидноклеточных пролифератов с признаками эмпериполеза – характеризуют массивную лимфаденопатию с синусовым гистиоцитозом – состояние, подобное нодальной форме болезни Розаи–Дорфмана, у пациента с первичным иммунодефицитом (рисунок 3).

Пациенту была инициирована первая линия терапии глюкокортикостероидами (преднизолон – 40 мг/м², коротким курсом, с постепенным снижением), после трех дней которой наблюдалось видимое сокращение увеличенных лимфатических узлов (поднижнечелюстных и надключичных слева). В дальнейшем предстоит оценить эффективность лечения в динамике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье продемонстрирован уникальный случай сочетания поздно диагностированного атипичного синдрома Вискотта–Олдрича у пациента без активной ранней клинической манифестации, дебютировавшего по типу X-сцепленной тромбоцитопении, с присоединившимися впоследствии признаками иммунной дисрегуляции (лимфаденопатия, лимфопения, дисгаммаглобулинемия) и развитием в подростковом возрасте выраженной лимфаденопатии. Состояние пациента по своей клинической картине (воспалительная активность без очагов инфекции, массивная лимфаденопатия), гистологической и иммуногистохимической картине лимфатического узла (наличие гистиоцитов, экспрессирующих S-100 и CD68, расширенные лимфатические синусы, эмпериполез) напоминало болезнь Розаи–Дорфмана, однако не полностью соответствовало классическому ее описанию.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Shvets O.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5347-7150>

Abramov D.S. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3664-2876>

Khoreva A.L. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7684-9188>

Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>

Kieva A.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2467-2840>

Pshonkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>

МНЕНИЕ ЭКСПЕРТА

А.Ю. Щербина, профессор, заведующая отделением иммунологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Синдром Вискотта–Олдрича уже фигурировал в рубрике «Школа иммунолога» ранее [41], и не случайно. Во-первых, СВО – один из наиболее частых комбинированных первичных иммунодефицитов [42], это заболевание часто попадает под прицел гематологов в связи с универсальным и легко распознаваемым симптомом – тромбоцитопенией, выявляемой при плановом исследовании общего анализа крови. В описанном случае тем не менее имело место значительное запаздывание диагноза, что, безусловно, ухудшило прогноз пациента не только в связи с поздним началом патогенетической терапии, но и с учетом того факта, что риски проведения куративного лечения СВО – трансплантации гематopoэтических стволовых клеток (ТГСК) – растут с возрастом пациента [43].

Однако в описанном случае имела место и другая проблема: сложность гистологической верификации лимфопролиферативного состояния у пациентов с ПИДС, имеющих подлежащие особенности состава лимфоцитарных популяций и архитектоники лимфоидной ткани. Доброкачественная лимфопролиферация – типичный симптом у пациентов с СВО любого возраста [4]. Однако, как сказано выше, пациенты с СВО, не получившие ТГСК в раннем возрасте, имеют риски развития лимфом, достигающих, по мнению некоторых авторов, 20% [14]. Именно поэтому так важна гистологическая верификация лимфопролиферативного синдрома у пациентов с СВО. При этом нередко у нетрансплантированных пациентов с СВО в течение жизни наблюдаются повторные эпизоды лимфопролиферации, каждый из которых, по нашему мнению, требует проведения биопсии. Недавно была показана роль WASP – белка, страдающего при СВО, – в супрессии Т-клеточных лимфом [44]. Таким образом, помимо нарушенного Т-клеточного надзора, мутации гена WASP обуславливают и другие механизмы лимфомогенеза.

В описанном выше случае при гистологическом исследовании увеличенного лимфоузла пациента с СВО, помимо характерных для БРД гистологических находок, имеются черты, характерные для основного его заболевания, а именно: истощение лимфоидной ткани, «выжженные» герминативные центры, формирование специфических гранулем [45]. В связи с этим морфологическая картина не была описана как классическая болезнь Розаи–Дорфмана.

Для адекватной интерпретации биопсийного материала, полученного от больных с ПИДС, необходимо знание патолога о подлежащем диагнозе и особенностях лимфоидной ткани при ПИДС. С другой стороны, выявление патологом нетипичной гисто-

логической картины лимфоузла должно сопровождаться высокой настороженностью по отношению к ПИДС даже у пациентов подросткового возраста и взрослых.

Литература

- Jin Y.Y., Wu J., Chen T.X., Chen J. When WAS Gene Diagnosis Is Needed: Seeking Clues Through Comparison Between Patients With Wiskott–Aldrich Syndrome and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Front Immunol* 2019; 10: 1549.
- Derry J.M., Ochs H.D., Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott–Aldrich syndrome. *Cell* 1994; 78: 635–44.
- Snapper S.B., Rosen F.S., Mizoguchi E., Cohen P., Khan W., Liu C.H., et al. Wiskott–Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* 1998; 9: 81–91.
- Notarangelo L.D., Miao C.H., Ochs H.D. Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 30–6.
- Imai K., Nonoyama S., Ochs H.D. WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 427–36.
- Aldrich R.A., Steinberg A.G., Campbell D.C. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis, and bloody diarrhea. *Pediatrics* 1954; 13: 133–9.
- Albert M.H., Bittner T.C., Nonoyama S., Notarangelo L.D., Burns S., Imai K., et al. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood* 2010; 115: 3231–8.
- Mahlaoui N., Pellier I., Mignot C., Jais J.P., Bilhou-Nabera C., Moshous D., et al. Characteristics and outcome of early-onset, severe forms of Wiskott–Aldrich syndrome. *Blood* 2013; 121: 1510–6.
- 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: 3797–804.
- Massaad M.J., Ramesh N., Geha R.S. Wiskott–Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013; 1285 (1): 26–43.
- Worth A.J., Thrasher A.J. Current and emerging treatment options for Wiskott–Aldrich syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11 (9): 1015–32.
- Candotti F. Clinical manifestations and pathophysiological mechanisms of the Wiskott–Aldrich syndrome. *J Clin Immunol* 2018; 38: 13–27.
- Zhang X., Dai R., Li W., Zhao H., Zhang Y., Zhou L., et al. Abnormalities of follicular helper T-cell number and function in Wiskott–Aldrich syndrome. *Blood* 2016; 127 (25): 3180–91.
- Perry G.S., Spector B.D., Schumann L.M., Mandel G.S., Anderson V.E., McHugh R.B., et al. The Wiskott–Aldrich syndrome in the United States and Canada (1892–1979). *J Pediatr* 1980; 97: 72–7.
- Cotelingam J.D., Witebsky F.G., Hsu S.M., Blaese R.M., Jaffe E.S. Malignant lymphoma in patients with the Wiskott–Aldrich syndrome. *Cancer Invest* 1985; 3: 515–22.
- Meropol N.J., Hicks D., Brooks J.J., Siminovitch K.A., Fishman N.O., Kant J.A., et al. Coincident Kaposi sarcoma and T-cell lymphoma in a patient with the Wiskott–Aldrich syndrome. *American Journal of Hematology* 1992; 40 (2): 126–34.
- Cooper M.D., Chase H.P., Lowman J.T., Krivit W., Good R.A. Wiskott–Aldrich syndrome: an immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity. *Am J Med* 1968; 44 (4): 499–513.
- Wolff J.A. Wiskott–Aldrich syndrome: clinical, immunologic and pathologic observations. *J Pediatr* 1967; 70 (2): 221–32.
- Blaese R.M., Strober W., Waldmann T.A. Immunodeficiency in the Wiskott–Aldrich syndrome. *Birth Defects* 1975; 11 (1): 250–4.
- Berglund G., Finnstrom O., Johansson S.G., Moiler K.L. Wiskott–Aldrich syndrome: a study of 6 cases with determination of the immunoglobulins A, D, G, M and ND. *Acta Paediatr Scand* 1968; 57 (2): 89–97.
- Blaese R.M., Strober W., Levy A.L., Wakhnann T.A. Hypercatabolism of IgG, IgA, IgM and albumin in the Wiskott–Aldrich syndrome: a unique disorder of serum protein metabolism. *J Clin Invest* 1971; 50 (11): 2331–8.
- Snover D.C., Frizzera G., Spector B.D., Perry III G.S., Kersey J.H. Wiskott–Aldrich syndrome: histopathologic findings in the lymph nodes and spleens of 15 patients. *Hum Pathol* 1981; 12 (9): 821–31.
- Hastrup J., Grahl-Madsen R. Wiskott–Aldrich syndrome: thrombocytopenia, eczema and recurrent infection. *Dan Med Bull* 1965; 12: 99–102.
- Ballow M., Dupont B., Good R.A. Auto-immune hemolytic anemia in Wiskott–Aldrich syndrome during treatments with transfer factor. *J Pediatr* 1973; 83: 772–80.
- Spitler L.E. Transfer factor therapy in the Wiskott–Aldrich syndrome: results of long-term follow-up in 32 patients. *Am J Med* 1979; 67 (1): 59–66.
- Risdall R.J., McKenna R.W., Nesbit M.E., Krivit W., Balfour Jr.H.H., Simmons R.L., Brunning R.D. Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer* 1979; 44 (3): 993–1002.
- Foucar E., Rosai J., Dorfman R.F., Eyman J.M. Immunologic abnormalities and their significance in sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy. *Am J Pathol* 1984; 82 (5): 515–25.
- Goyal G., Ravindran A., Young J.R., Shah M.V., Bennani N.N., Patnaik M.M.,

- et al. Mayo Clinic Histiocytosis Working Group. Clinicopathological features, treatment approaches, and outcomes in Rosai–Dorfman disease. *Haematologica* 2019; 219626. DOI: 10.3324/haematol.2019.219626
29. Rosai J., Dorfman R.F. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy. A newly recognized benign clinicopathological entity. *Arch Pathol* 1969; 87 (1): 63–70.
30. Foucar E., Rosai J., Dorfman R. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai–Dorfman disease): review of the entity. *Semin Diagn Pathol* 1990; 7 (1): 19–73.
31. Paulli M., Bergamaschi G., Tonon L., Viglio A., Rosso R., Faccetti F., et al. Evidence for a Polyclonal Nature of the Cell Infiltrate in Sinus Histiocytosis with Massive Lymphadenopathy (Rosai–Dorfman Disease). *Br J Haematol* 1995; 91 (2): 415–8.
32. Young J.R., Johnson G.B., Murphy R.C., Go R.S., Broski S.M. (18)F-FDG PET/CT in Erdheim–Chester Disease: Imaging Findings and Potential BRAF Mutation Biomarker. *J Nucl Med* 2018; 59 (5): 774–9.
33. Абрамов Д.С., Мякова Н.В., Абугова Ю.Г., Грачев Н.С., Дьяконова Ю.Ю., Калинина М.П. и др. Синусовый гистиоцитоз с массивной лимфаденопатией (болезнь Розаи–Дорфмана). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2014; 4 (13): 63–8.
34. Fu W.J., Du J., Lu J., Wang L.Z., Yang J.M., He M.X., et al. Rosai–Dorfman disease: a clinicopathologic analysis and whole exome sequencing in 23 cases. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2019; 40 (8): 656–61.
35. Maric I., Pittaluga S., Dale J.K., Niemela J.E., Delsol G., Diment J., et al. Histologic features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Surg Pathol* 2005; 29 (7): 903–11.
36. Gualco G., van den Berg A., Koopmans S., Bacchi L.M., Carneiro S.S., Ruiz E.Jr., et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with a new minimal deletion in the death domain of the FAS gene. *Hum Pathol* 2008; 39 (1): 137–41.
37. Xie Y., Pittaluga S., Price S., Raffeld M., Hahn J., Jaffe E.S., et al. Bone marrow findings in autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline FAS mutation. *Haematologica* 2017; 102 (2): 364–72.
38. Venkataraman G., McClain K.L., Pittaluga S., Rao V.K., Jaffe E.S. Development of disseminated histiocytic sarcoma in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and associated Rosai–Dorfman disease. *Am J Surg Pathol* 2010; 34 (4): 589–94.
39. Gupta N., Verma R., Belho E.S., Manocha A. Isolated Extranodal Rosai–Dorfman Disease on 18F-FDG PET-CT Scan. *Indian J Nucl Med* 2019; 34 (4): 319–20.
40. 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 (13): 4010–9.
41. Нестеренко З.А., Кузьменко Н.Б., Бурлаков В.И., Викторова Е.А., Ведмедская В.А., Першин Д.Е. и др. Феномен реверсной мутации у пациента с синдромом Вискотта–Олдрича. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 18 (3): 104–11.
42. Мухина А.А., Кузьменко Н.Б., Родина Ю.А., Кондратенко И.В., Бологов А.А., Латышева Т.В. и др. Характеристика пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями в Российской Федерации: от рождения до старости. *Педиатрия* 2019; 98 (3): 24–31.
43. Балашов Д.Н., Козловская С.Н., Радыгина С.А., Лаберко А.П., Султанова Э.Р., Шелихова Л.Н. и др. Успехи проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при синдроме Вискотта–Олдрича. *Педиатрия* 2019; 98 (3): 54–9.
44. Menotti M., Ambrogio C., Cheong T.C., Pighi C., Mota I., Cassel S.H., et al. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) is a tumor suppressor in T-cell lymphoma. *Nat Med* 2019; 25 (1): 130–40.
45. Facchetti F., Blanzuoli L., Ungari M., Alebardi O., Vermi W. Lymph node pathology in primary combined immunodeficiency diseases *Springer Semin Immunopathol* 1998; 19: 459–78.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 19.09.2019
Принята к печати 18.11.2019

Контактная информация:

Калинина Ирина Игоревна, врач-гематолог отделения детской гематологии/онкологии НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: irina.kalinina@fccho-moscow.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-116-121

Гиперлейкоцитоз у детей с острым миелоидным лейкозом

Н.В. Захаров¹, И.И. Калинина², Д.А. Венёв², Т.Ю. Салимова², Д.А. Евсеев², О.В. Горонкова², А.А. Масчан²

¹ КГБУ «Красноярский краевой клинический центр охраны матери и детства» Минздрава России, Красноярск

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Статья представляет собой анализ последних публикаций, посвященных гиперлейкоцитозу при остром миелоидном лейкозе у детей. Подробно рассмотрены механизмы развития жизнеугрожающих осложнений, сопровождающих гиперлейкоцитоз. В данном обзоре литературы авторы акцентируют внимание на адекватности и сроках проведения терапии таких жизнеугрожающих осложнений гиперлейкоцитоза, как лейкостаз, ДВС-синдром, синдром острого лизиса опухоли. Авторы подчеркивают, что в лечении гиперлейкоцитоза важное место, помимо специфической терапии, занимает сопроводительная терапия в условиях отделения интенсивной терапии. Обсуждается место заменной гемотрансфузий и лейкофереза в составе сопроводительной терапии.

Ключевые слова: дети, острый миелоидный лейкоз, гиперлейкоцитоз, химиотерапия

Захаров Н.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 116–121.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-116-121

Hyperleucocytosis in children with acute myeloid leukemia

N.V. Zacharov¹, I.I. Kalinina², D.A. Venev², T.Y. Salimova², D.A. Evseev², O.V. Goronkova², A.A. Maschan²

¹ Krasnoyarsk Clinical Center of maternity and childhood, Krasnoyarsk

² Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

This article presents analysis of recent publications on hyperleukocytosis in children with AML. The mechanisms of the development of life-threatening complications accompanying hyperleukocytosis are analyzed in detail. In this review of the literature, the authors focus on the adequacy and timing of therapy for such life-threatening complications of hyperleukocytosis as leukostasis, DIC, and acute tumor lysis syndrome. The authors emphasize that in the treatment of hyperleukocytosis an important place, in addition to specific therapy, is taken by the accompanying therapy in the intensive care unit. The place of replacement blood transfusions and leukopheresis as part of the accompanying therapy is discussed.

Key words: children, acute myeloid leukemia, chemotherapy

Zacharov N.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 116–121.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-116-121

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 19.09.2019

Accepted 18.11.2019

Correspondence:

Irina I. Kalinina, MD, Pediatrician Hematologist, Department of Pediatric Hematology/Oncology 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: irina.kalinina@fccho-moscow.ru

Гиперлейкоцитоз (ГЛ) при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) может привести к лейкостазу – угрожающему жизни осложнению, вызванному адгезией лейкоэмических клеток в капиллярах [1, 2]. ГЛ является критерием «высокого риска» лейкозного процесса, способствует повышению летальности из-за метаболических нарушений, обусловленных массивным распадом опухолевых клеток – синдром опухолевого лизиса (СОЛ), а также нарушением мозгового и легочного кровообращения вследствие лейкостаза. Осложнения лейкостаза – это прогрессирующие неврологические и респираторные нарушения, обусловленные инфильтрацией мелких сосудов и их окклюзией бластными клетками [3–6].

В отсутствие лечения прогрессирует гипервязкость крови, вызванная высоким уровнем лейкоцитов, что может привести к полиорганной недостаточности и смерти. Около 10–20% больных с лейкостазом

погибают от интракраниальных кровоизлияний и дыхательной недостаточности [6–8], обусловленных массивной агрегацией бластных клеток в микрососудистом русле легких, головного мозга и других органов; при легочном лейкостазе поражаются также паренхима и альвеолы (рисунок).

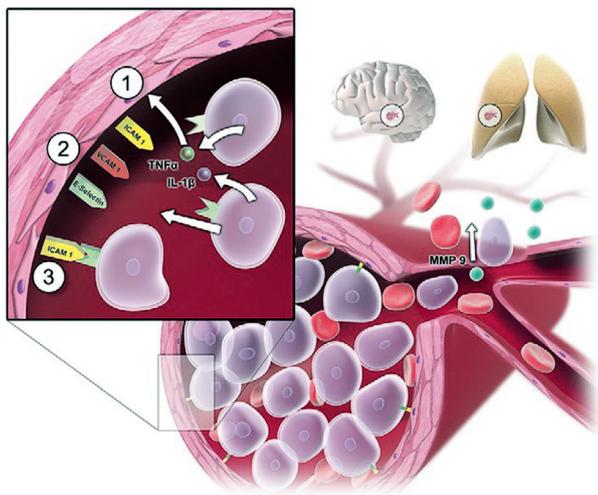
Склеивание миелобластов – причина механической обструкции мелких сосудов – приводит к нарушению перфузии в микроциркуляторном русле в головном мозге, легких. Тканевая инвазия миелобластов опосредуется металлопротеиназами (ММП-9), которые экспрессируются на клеточной поверхности и секретируются во внеклеточный матрикс. Клиническая симптоматика включает геморрагический синдром, тахи- и диспноэ, гипоксию, инфильтративные изменения в легких и дыхательную недостаточность. Со стороны центральной нервной системы (ЦНС) наблюдаются ментальные расстрой-

Рисунок

Патогенетические механизмы лейкостаза [6]: шаг 1 – секреция цитокинов (TNF α , IL – 1 β) миелобластами; шаг 2 – активация эндотелиальных рецепторов адгезии (ICAM 1, VCAM 1, E-selectin); шаг 3 – адгезия миелобластов на эндотелии

Figure

Pathogenetic mechanisms of leukostasis [6]: step 1 – cytokines secretion (TNF α , IL – 1 β) by myeloblasts; step 2 – endothelial adhesion receptors activation (ICAM 1, VCAM 1, E-selectin); step 3 – endothelial myeloblasts adhesion



ства, атаксия, диплопия, нарушения слуха, хорея либо сомноленция; офтальмологические нарушения – отек дисков зрительных нервов, кровоизлияния и экссудаты в сетчатке с возможной ее отслойкой, тромбоз вен глазного дна. Возможны кардиоваскулярные нарушения в виде прогрессирующей сердечной недостаточности, стенокардии и аритмии.

Наибольший риск развития лейкостаза наблюдается у детей с М5 вариантом ОМЛ. Известно, что монобласты обладают более высокой, чем другие лейкоэмические бластные клетки, способностью к адгезии, инвазии и выживаемости в тканях, а также более высокой метаболической активностью и продукцией большого числа цитокинов и литических ферментов, усугубляющих нарушения, вызванные монобластами в тканях почек, легких и головного мозга [6, 7, 9].

Патогенетические механизмы лейкостаза

Начальная фаза нормальной лейкоцитарной адгезии в месте воспаления опосредована селектинами, которые взаимодействуют с интегринами для распределения лейкоцитов вдоль сосудистого эндотелия [6, 10–12]. Лейкоциты подвергаются воздействию воспалительных медиаторов, которые активируют интегрин и облегчают интегрин-опосредованную адгезию. Эндотелий воздействует на воспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли (TNF α , интерлейкин (IL)-1 β или IL-4), которые требуются для экспрессии эндотелиальных адгезионных рецепторов, способных поддерживать лейкоцитарный пул. Адгезия миелобластов к эндо-

телию, активируемому цитокинами, опосредована E-селектином, ICAM-1 и VCAM-1 (рисунок).

Распространение бластных клеток в экстрамедуллярных очагах при лейкостазе – одна из проблем при лечении пациентов с ОМЛ. Миелобласты могут способствовать их собственной адгезии к неактивированному сосудистому эндотелию, что может сыграть важную роль в патогенезе лейкостаза и тканевой инвазии [6, 13–15].

На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

- экспрессия адгезионных рецепторов среди подтипов ОМЛ М0–М5 (по FAB-классификации) сильно гетерогенная;
- адгезия лейкоэмических клеток к TNF- α -активированным эндотелиальным клеткам опосредована селектинами и интегринами;
- миелобласты постепенно накапливаются на неактивированном эндотелии, индуцируя экспрессию рецептора адгезии эндотелиальных клеток, включая E-селектин, P-селектин, VCAM-1 и ICAM-1;
- секреция цитокинов миелобластами и адгезия лейкозных бластных клеток к эндотелиальным клеткам с помощью специфических адгезионных рецепторов играют важную роль в развитии лейкостаза.

Высокое количество лейкоцитов может вызывать три основных осложнения: синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), СОЛ и лейкостаз.

Развитие ДВС – это заключительное проявление активации системы гемостаза с включением всех его звеньев. При этом происходит процесс усиленной внутрисосудистой коагуляции – в крови присутствует значительное количество тромбина, вызывающего системную активацию и последующее потребление «факторов-субстратов» (фибриногена, протромбина, факторов V, VIII и др.), антикоагулянтов и тромбоцитов; происходит частичная обструкция наиболее мелких сосудов с ишемическими нарушениями в органах, где в дальнейшем обнаруживают реактивный фибринолиз.

Лечение ДВС-синдрома включает:

- поддержание адекватного внутрисосудистого объема (минимизация эффектов любого тромбоза);
- ранние и повторные трансфузии больших количеств свежезамороженной плазмы (СЗП) – 20 мл/кг/сут; у взрослых – не менее 800–1000 мл/сут;
- повторные переливания тромбомассы (40 мл на 10 кг массы);
- криопреципитат – 5 мл/кг при кровотечении и сниженном уровне фибриногена (< 1 г/л).

При лечении ДВС-синдрома не рекомендуется гепаринотерапия путем длительных инфузий под контролем АЧТВ [16–18].

Синдром острого лизиса – это комплекс нарушений в результате массивного распада опухолевых клеток и высвобождения в плазму и периферические ткани внутриклеточного содержимого и метаболитов.

Метаболические нарушения:

- в результате лизиса клеток происходит массивный выброс во внеклеточное пространство следующих субстанций: калия, фосфатов, дериватов пуриновых и пиримидиновых оснований, вазоактивных веществ, лактата;
- соединение внеклеточного кальция с фосфатами приводит к образованию слаборастворимых фосфатов кальция и опосредованно – к снижению уровня кальция – гипокальциемии.

Гемодинамические нарушения. Гиперкалиемия в результате острого нарушения проводимости вызывает нарушения сердечного ритма вплоть до остановки сердца. Гиперфосфатемия, лактацидоз, гипокальциемия приводят к снижению сократительной функции миокарда и как результат – снижению сердечного выброса с развитием артериальной гипотензии.

Острое повреждение почек. В результате метаболизма, преимущественно в печени, из дериватов нуклеиновых кислот в избыточном количестве образуются мочевая кислота, ксантины и гипоксантины. В условиях лактат-ацидоза, гипотензии, активации воспалительных реакций выведение почками продуктов массивного цитолиза замедлено. Слаборастворимые соли мочевой кислоты (ураты), ксантины и гипоксантины выпадают в осадок в кислой среде, преципитируют в почечных канальцах (уратная нефропатия).

Фосфаты кальция выпадают в осадок в щелочной среде и преципитируют также в почечных канальцах (нефрокальциноз). Кристаллизация уратов и фосфатов в канальцах сопровождается выбросом медиаторов воспалительных реакций, приводящих к отеку, вазоконстрикции и дополнительной обструкции почечных канальцев. Процесс чаще всего усугубляется поражением самих почек лейкоэмическими клетками; результат – необратимые изменения в почечных канальцах, их некроз.

Профилактика СОЛ включает:

- проведение гипергидратации – 3 л/м²/сут с форсированным диурезом (> 2 мл/кг/ч) и профилактическим приемом аллопуринола в дозе 10 мг/кг/сут;
- алкализация мочи: назначают бикарбонат натрия – 40–80 ммоль/л до достижения pH 7 в моче с целью улучшить растворение уратов и почечный

кровоток, что способствует переходу калия в клетку и стабилизирует миокард;

- гиперурикемия может привести к поражению почек, поэтому назначают аллопуринол – 10 мг/кг/сут, *per os*, или расбуриказу (фастуртек) – 0,2 мг/кг/сут, внутривенно, в зависимости от уровня мочевой кислоты. Аллопуринол – менее дорогостоящий препарат, но его применяют только с целью предотвращения синтеза новой мочевой кислоты; в случае выраженной гиперурикемии и СОЛ назначают расбуриказу (уратоксидазу), которая эффективно снижает уровень мочевой кислоты путем ферментативной деградации даже после однократного применения.

Консервативное лечение гиперкалиемии проводят при уровне калия выше верхней границы нормы. При неэффективности терапии показан срочный гемодиализ [6, 19, 20].

Лейкостаз развивается при участии двух основных механизмов. Реологическая модель основана на механическом нарушении в потоке крови за счет увеличения вязкости в микроциркуляции [1, 2, 5]. С одной стороны, миелоидные бласты больше, чем лимфоидные или поверхностные гранулоциты, с другой – лейкозные бласты значительно менее деформируемы, чем зрелые лейкоциты, – это объясняет более высокий уровень лейкостатических осложнений при ОМЛ, в отличие от острого лимфобластного, хронического миелоидного или хронического лимфоцитарного лейкозов [18, 21]. Кроме того, цитокиновое эндотелиальное повреждение, последующее кровоизлияние, гипоксическое повреждение и экстравазация при ОМЛ путем последовательного повреждения ткани матричными металлопротеазами могут вносить свой вклад в патогенез лейкостаза [22–24].

Терапия гиперлейкоцитоза

Учитывая жизнеугрожающие осложнения, связанные с развитием лейкостаза, специфическую терапию при ОМЛ с ГЛ следует начинать незамедлительно, под контролем врачей – гематологов и реаниматологов. Важна также роль сопроводительной терапии, особенно гемотрансфузионная терапия и терапии неотложных состояний, вплоть до проведения искусственной вентиляции легких (ИВЛ), почечной заместительной терапии.

Специфическая терапия. Международных рекомендаций по проведению циторедуктивной фазы индукции не существует. Посиндромная терапия лейкостатических осложнений требует госпитализации в отделения интенсивной терапии и не всегда эффективна, поэтому их профилактика представляется наиболее важной при лечении детей с риском развития лейкостаза.

Известно, что химиотерапия со стандартными дозами цитозара (Ага-С) зачастую провоцирует развитие синдрома лейкостаза, поэтому с целью его профилактики используют: лейкаферез, обменные переливания крови и циторедукцию, направленную на постепенное снижение количества бластов в крови. Один из популярных режимов циторедукции – комбинация 6-тигуанина в дозе 40 мг/м²/сут и Ага-С в той же дозе. Альтернативный метод – назначение гидроксимочевины в дозе 40 мг/кг/сут [17, 25]. Группа исследователей госпиталя *St. Jude* использует в индукции ремиссии кладрибин, обладающий наибольшей эффективностью в отношении М5-варианта [26], что, по их мнению, становится причиной низкой смертности больных с гиперлейкоцитозом [27].

В случае ГЛ при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ, М3-вариант ОМЛ) рекомендуют незамедлительно начинать специфическую терапию весаноидом и вводить антрациклины; некоторые авторы предлагают использовать триоксид мышьяка [6, 28, 29]. В качестве дополнительной патогенетической терапии применяют:

- дексаметазон в дозе 0,6–0,8 мг/кг/сут, внутривенно, на три введения, до тех пор, пока уровень лейкоцитов в гемограмме не достигнет $20 \times 10^9/\text{л}$;
- трентал – 20 мг/кг/сут, постоянной инфузией;
- при заместительных трансфузиях эритроцитов уровень гемоглобина не должен превышать 70 г/л.

Дексаметазон используют как дополнение к химиотерапии в целях уменьшения продукции цитокинов, агрегации бластов к эндотелиальным клеткам и накопления бластов в интерстиции. Применение дексаметазона целесообразно при респираторном дистресс-синдроме легких (РДС), в основе которого лежат факторы, приводящие к тому, что в интерстициальной ткани легких и капиллярах органа в большом количестве собираются активированные лейкоциты и тромбоциты, происходит выделение множества биологически активных веществ: простагландинов, протеиназ, лейкотриенов, токсических кислородных радикалов, которые повреждают альвеолярный эпителий и эндотелий сосудов, меняют реактивность сосудов, тонус бронхиальной мускулатуры, способствуют развитию фиброза. В результате увеличивается проницаемость сосудов, происходит спазм легочных капилляров, повышается давление внутри них. Фиксируется выраженное пропотевание плазмы и эритроцитов в альвеолы и интерстициальную ткань легких, развиваются отек легких и ателектаз. Основным методом терапии острого РДС – ИВЛ. Поскольку в основе повреждения легких при РДС лежат воспалительные процессы, логично пред-

положить, что применение противовоспалительных средств, прежде всего кортикостероидов, может улучшать результаты лечения. Применение преднизолона в максимальной дозе 30 мг/кг/сут может играть положительную роль при развитии РДС [30–32]. Однако нельзя забывать, что прием дексаметазона увеличивает риск инфекционных осложнений у больных с ОМЛ, поэтому в протоколе ОМЛ–ММ–2006 продолжительность введения дексаметазона ограничена – до достижения уровня лейкоцитов $20 \times 10^9/\text{л}$. В качестве сопроводительной терапии необходимо применение антисекреторных препаратов (омез, нексиум) и противогрибковая профилактика, направленная против плесневых грибов (позаконазол, вориконазол) [33].

Трентал® – вазодилатирующий препарат, улучшающий микроциркуляцию, ангиопротектор, производное ксантина. Трентал® улучшает реологические свойства крови (текучесть) за счет воздействия на патологически измененную деформируемость эритроцитов, ингибируя агрегацию тромбоцитов и снижая повышенную вязкость крови. Улучшает микроциркуляцию в зонах нарушенного кровообращения.

Тактика заменных гемотрансфузий. С целью уменьшения вязкости крови и как следствие лейкостатического поражения органов рекомендовано уменьшить количество гемотрансфузий на этапе проведения индукционной терапии. Уровень гемоглобина для пациентов с ГЛ не должен превышать 70 г/л. Трансфузии тромбоконцентрата и СЗП следует проводить по строгим показаниям при развитии ДВС-синдрома и/или геморрагических осложнений.

Лейкаферез – этот термин происходит от греческого «отнять». Приняты стандарты для лечения ДВС и СОЛ, при этом использование лейкафереза при гиперлейкоцитозе в циторедукции по-прежнему остается темой дебатов. Лейкаферез при ГЛ основан на принципе быстрого удаления излишних лейкоцитов механическим способом. Механическое удаление лейкоцитов в процессе лейкафереза стало общедоступно во многих гематологических центрах. Если аферезное оборудование отсутствует, производят заменное переливание крови и/или плазмы – этот метод можно использовать в качестве альтернативной стратегии уменьшения количества лейкоцитов [16, 6]. В современных устройствах афереза (сепараторы клеток крови) лейкоциты и их предшественники отделяются от крови пациента путем центрифугирования. При одиночном лейкаферезе количество лейкоцитов может быть уменьшено в пределах от 10 до 70% [34].

Эффективность лейкафереза для уменьшения количества лейкоцитов была показана в нескольких клинических испытаниях, однако есть две основные

причины, по которым использование лейкафереза у пациентов с ГЛ все еще находится в стадии обсуждения. Во-первых, основная часть лейкоцитарной массы опухоли находится в костном мозге – эти клетки быстро мобилизуются в периферическую кровь после успешного лейкафереза [25, 35]. Второе, более важное условие состоит в том, что благоприятный клинический эффект на ранних этапах индукционной терапии не был показан в клинических испытаниях. Результаты проведенных исследований нельзя обобщать из-за гетерогенности представленной популяции пациентов. При сравнении пациентов, которым был выполнен лейкаферез, и пациентов тех учреждений, где используют политику «никогда» или «иногда», положительных эффектов не доказано. Исследователи не наблюдали связи между процентом пациентов, получавших лейкаферез, и частотой ранней смерти [6, 36, 37].

Лейкаферез повторяют ежедневно до исчезновения симптомов лейкостаза и снижения уровня лейкоцитов менее $100 \times 10^9/\text{л}$. Циторедуктивные методы лечения следует использовать незамедлительно при диагностике ОМЛ, их нельзя отсрочить или отложить из-за проведения процедуры лейкафереза. Профилактический лейкаферез не имеет преимуществ по сравнению с интенсивной индукционной химиотерапией и поддерживающей терапией, в том числе у пациентов с СОЛ. При ОПЛ лейкаферез может привести к коагулопатии и увеличить частоту осложнений, поэтому не рекомендован.

Эффективное сокращение уровня лейкоцитов и хорошо переносимая процедура делают лейкаферез возможным методом терапии, однако необходимость дополнительного доступа, использование антико-

агулянтов, усугубляющих риск геморрагических осложнений у пациентов с ДВС и тромбоцитопенией, а также электролитный дисбаланс затрудняют применение данной процедуры, особенно у детей младшей возрастной группы [6, 16, 29, 36].

ВЫВОДЫ

Несмотря на повышение эффективности терапии ОМЛ за счет проведения высокодозной ПХТ и ТГСК, а также сопроводительной терапии, пациенты с высоким инициальным числом лейкоцитов представляют особую популяцию больных, характеризующихся высокой частотой развития фатальных осложнений, таких как лейкостаз, РДС, СОЛ, ДВС, что требует незамедлительного проведения интенсивной терапии, желателен в условиях ОРИТ. Специфическую терапию таким пациентам необходимо начинать незамедлительно, с момента установления диагноза. Обсуждается вопрос о необходимости лейкофереза и заменных переливаний крови в составе сопроводительной терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Kalinina I.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0813-5626>

Venyov D.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0183-1530>

Salimova T.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2958-1705>

Evseev D.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8610-0624>

Goronkova O.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8571-5395>

Maschan A.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Литература

- McKee L.C., Collins R.D. Intravascular leukocyte thrombi and aggregates as a cause of morbidity and mortality in leukemia. *Med (United States)*. 1974.
- Lichtman M.A., Rowe J.M. Hyperleukocytic Leukemias: Rheological, Clinical, and Therapeutic Considerations. *Blood* 1982; 60: 279–83.
- Chim C.S., Ooi C. The irreplaceable image. *Haematologica* 2001; 86: 1231.
- Kaminsky D.A., Hurwitz C.G., Olmstead J.I. Pulmonary leukostasis mimicking pulmonary embolism. *Leuk Res* 2000. DOI: 10.1016/S0145-2126(99)00162-9
- Stucki A., Rivier A.S., Gikic M., Monai N., Schapira M., Spertini O. Endothelial cell activation by myeloblasts: Molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. *Blood* 2001; 97 (7): 2121–9.
- Röllig C., Ehninger G. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2015; 125 (21): 3246–52.
- Creutzig U., Ritter J., Budde M., Sutor A., Schellong G. Early deaths due to hemorrhage and leukostasis in childhood acute myelogenous leukemia. Associations with hyperleukocytosis and acute monocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60 (12): 3071–9.
- Würthner J.U., Köhler G., Behringer D., Lindemann A., Mertelsmann R., Lübbert M. Leukostasis followed by hemorrhage complicating the initiation of chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia and hyperleukocytosis: A clinicopathologic report of four cases. *Cancer* 1999; 85 (2): 368–74.
- Campana D., Pui C.H. Childhood Leukemia. In: *Abeloff's Clinical Oncology: Fifth Edition* 2014; 1849–72.e11.
- Steeber D.A., Campbell M.A., Basit A., Ley K., Tedder T.F. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95 (13): 7562–7. DOI: 10.1073/pnas.95.13.7562
- Vestweber D., Blanks J.E. Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands. *Physiol Rev* 1999.

- DOI: 10.1152/physrev.1999.79.1.181
12. Kansas G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259–87.
 13. Lowenberg B., Downing J.R., Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 1999 Sep; 341 (14): 1051–62.
 14. Extermann M., Bacchi M., Monai N., Fopp M., Fey M., Tichelli A., et al. Relationship Between Cleaved L-Selectin Levels and the Outcome of Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 1998; 92: 3115–22.
 15. Byrd J.C., Weiss R.B., Arthur D.C., Lawrence D., Baer M.R., Davey F. et al. Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22;q22): Results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *J Clin Oncol* 1997; 15 (2): 466–75.
 16. Ganzel C., Becker J., Mintz P.D., Lazarus H.M., Rowe J.M. Hyperleukocytosis, leukostasis and leukapheresis: Practice management. *Blood Rev* 2012; 26 (3): 117–22.
 17. Levi M., Toh C.H., Thachil J., Watson H.G. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* 2009; 145 (1): 24–33.
 18. Porcu P., Cripe L., Ng E., Bhatia S., Danielson C., Orazi A., et al. Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: A review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leukemia and Lymphoma* 2000; DOI: 10.3109/10428190009053534
 19. Coiffier B., Altman A., Pui C.H., Younes A., Cairo M.S. Guidelines for the management of pediatric and adult tumor lysis syndrome: An evidence-based review. *J Clin Oncol* 2008; 26 (16): 2767–78.
 20. Darmon M., Guichard I., Vincent F. Rasburicase and tumor lysis syndrome: Lower dosage, consideration of indications, and hyperhydration. *J Clin Oncol* 2011; 29 (3): e67–e68, author reply 69.
 21. Bunin N.J., Pui C.H. Differing complications of hyperleukocytosis in children with acute lymphoblastic or acute non-lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1985; 3 (12): 1590–5.
 22. Hatfield K.J., Reikvam H., Bruserud O. The crosstalk between the matrix metalloprotease system and the chemokine network in acute myeloid leukemia. *Curr Med Chem* 2010; 17 (36): 4448–61.
 23. Hatfield K.J., Bedringsaas S.L., Rynning A., Gjertsen B.T., Bruserud O. Hypoxia increases HIF-1 α expression and constitutive cytokine release by primary human acute myeloid leukaemia cells. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21 (3): 154–64.
 24. Paupert J., De Mas V.M., Demur C., Salles B., Muller C. Cell-surface MMP-9 regulates the invasive capacity of leukemia blast cells with monocytic features. *Cell Cycle* 2008; 7 (8): 1047–53.
 25. Porcu P., Farag S., Marcucci G., Cataland S.R., Kennedy M.S., Bissell M. Leukocytoreduction for acute leukemia. *Ther Apher* 2002; 1: 15–23.
 26. Robak T., Wrzesien-Kus A., Lech-Maranda E., Kowal M., Dmoszynska A. Combination regimen of cladribine (2-Chlorodeoxyadenosine), cytarabine and G-CSF (CLAG) as induction therapy for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000; 1–2: 121–9.
 27. Krance R.A., Krance R.A., Hurwitz C.A., Head D.R., Raimondi S.C., Behm F.G., et al. Experience with 2-chlorodeoxyadenosine in previously untreated children with newly diagnosed acute myeloid leukemia and myelodysplastic diseases. *J Clin Oncol* 2001; 11: 2804–11.
 28. De Botton S., Dombret H., Sanz M., San Miguel J., Caillot D., Zittoun R. Incidence, clinical features, and outcome of all trans-retinoic acid syndrome in 413 cases of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1998; 92: 2712–8.
 29. Adès L., Guerci A., Raffoux E., Sanz M., Chevallier P., Lapusan S., et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: The European APL Group experience. *Blood* 2010; 115: 1690–6.
 30. Azoulay É., Canet E., Raffoux E., Lengline E., Lemiale V., Vincent F., et al. Dexamethasone in patients with acute lung injury from acute monocytic leukaemia. *Eur Respir J* 2012; 39 (3): 648–53.
 31. Meduri G., Headley A., Golden E., Carson S., Umberger R., Kelso T., Tolley E. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 1998; 280: 159–65.
 32. Mercat A., Diehl J., Michard F., Anguel N., Teboul J., Labrousse J., et al. Extending inspiratory time in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001; 29 (1): 40–4.
 33. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Самочатова Е.В. Сопроводительная терапия и контроль инфекций при гематологических и онкологических заболеваниях. – М.: Медпрактика-М, 2009.
 34. Holig K., Moog R. Leukocyte depletion by therapeutic leukocytapheresis in patients with leukemia. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2012; 39 (4): 241–5.
 35. Bruserud O., Liseth K., Stamnesfet S., Cacic D.L., Melve G., Kristoffersen E., et al. Hyperleukocytosis and leukocytapheresis in acute leukaemias: Experience from a single centre and review of the literature of leukocytapheresis in acute myeloid leukaemia. *Transfus Med* 2013; 23 (6): 397–406.
 36. Pastore F., Pastore A., Wittmann G., Hiddemann W., Spiekermann K. The role of therapeutic leukapheresis in hyperleukocytotic AML. *PLoS One*, 2014; 9(4): e95062.
 37. Oberoi S., Lehrnbecher Th., Phillips B., Hitzler J., Ethier M.-C., Beyene J., et al. Leukapheresis and low-dose chemotherapy do not reduce early mortality in acute myeloid leukemia hyperleukocytosis: A systematic review and meta-analysis. *Leuk Res* 2014; 38 (4): 460–8.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 19.09.2019
Принята к печати 18.11.2019

Контактная информация:
Иванашкин Алексей Юрьевич, врач анестезиолог-реаниматолог, НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ivanashkin@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-122-130

Дыхательная недостаточность у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями и методы ее коррекции

А.Ю. Иванашкин¹, В.В. Лазарев^{1, 2}

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

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

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) на фоне инфекционного поражения легких – одна из основных причин летального исхода у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями. Это связано с тем, что у 16–24% таких пациентов не удается скорректировать критическую гипоксемию традиционными методами искусственной вентиляции легких (ИВЛ). У пациентов с ОРДС методом выбора при лечении критической гипоксемии служит экстракорпоральная мембранная оксигенация (ЭКМО), однако выраженная цитопения, иммуносупрессия и нарушения в системе гемостаза являются абсолютными противопоказаниями к ЭКМО в связи с высоким риском развития большого количества фатальных осложнений. Таким образом, остается актуальной проблема поиска альтернативных методов ИВЛ, направленных на улучшение оксигенации и газообмена при тяжелых формах ОРДС у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями. Один из таких методов – сочетанная высокочастотная струйная вентиляция легких.

Ключевые слова: острый респираторный дистресс-синдром, искусственная вентиляция легких, высокочастотная вентиляция легких, сочетанная высокочастотная вентиляция легких, дети, онкогематология, иммунология.

Иванашкин А.Ю. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 122–130.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-122-130

Respiratory failure in children with oncohematological and immunological diseases: methods of treatment

A.Y. Ivanashkin¹, V.V. Lazarev^{1, 2}

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

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) against the background of a lung infection is one of the chief reasons for a fatal outcome in children with oncohematological and immunological diseases. This is due to the fact that in 16–24% of these patients, it is not possible to treat critical hypoxemia successfully using the traditional methods of mechanical ventilation (MV) of the lungs. For patients with ARDS, the method of choice for treating critical hypoxemia is extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), but pronounced cytopenia, immunosuppression and hemostatic system disorders constitute absolute contraindications for ECMO, owing to a high risk of numerous fatal complications. Therefore, there remains currently a rather relevant problem: specifically, the search for alternative methods of mechanical ventilation, which would aim to improve oxygenation and gas exchange during severe forms of ARDS in children with oncohematological and immunological diseases. One of such methods is superimposed high-frequency jet ventilation (SHFJV).

Key words: acute respiratory distress syndrome, mechanical ventilation, high-frequency ventilation, superimposed high-frequency jet ventilation, children, oncohematology, immunology.

Ivanashkin A.Y., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 122–130.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-122-130

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 19.09.2019

Accepted 18.11.2019

Correspondence:
Alexey Y. Ivanashkin, MD, Intensive Care Unit, 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: ivanashkin@mail.ru

За последние несколько десятилетий смертность у детей с депрессиями, кроветворения, гемобластомами и солидными образованиями снизилась с 85 до 25%, что обусловлено совершенствованием протоколов химиотерапии, применением более агрессивных методик лечения, улучшением качества сопроводительной терапии [1]. Вместе с тем большое количество осложнений остается значимой преградой на пути выздоровления детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями. От 40 до 70% всех осложнений приходится на инфек-

ционные процессы различной этиологии, которые являются главной причиной летального исхода, не связанного с прогрессией основного заболевания [2, 3]. Развитие инфекционных осложнений обусловлено индуцированной иммуносупрессией, нарушением целостности естественных анатомических барьеров, органическими нарушениями, обширными оперативными вмешательствами. Инфекционное поражение легких с развитием острой дыхательной недостаточности – наиболее частое осложнение у детей с онкогематологическими и иммунологи-

ческими заболеваниями и основная причина их перевода в отделение реанимации и интенсивной терапии [4].

Нейтропения – один из основных факторов риска развития инфекционных осложнений в организме, частота которых начинает возрастать, когда число гранулоцитов становится менее 1000 в мм^3 , и значительно увеличивается, если их число менее 500 мм^3 [5]. Развитие инфекционного процесса в этих условиях носит стремительный характер, а его диагностика представляет собой достаточно сложную задачу и имеет свои особенности. Это связано со спецификой основного заболевания, отсутствием классических признаков воспаления и температурных реакций на фоне иммуносупрессии и проводимой стероидной терапии, отсутствием четко сформированного очага инфекции.

Поздняя диагностика и стремительное течение инфекционного процесса сопровождаются развитием сепсиса, септического шока и органной дисфункции, требующих проведения интенсивной терапии и протезирования нарушенных функций. Дети с нейтропенией и легочным повреждением имеют очень низкие показатели выживаемости, так как повреждение легких наиболее часто сопровождается развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [6]. Высокая летальность при этом регистрируется как у больных с солидными опухолями (80%), так и у пациентов с лейкозами (70%) и иммунодефицитами (82%) [7]. Наиболее неблагоприятный исход при развитии ОРДС отмечен у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), летальность среди них достигает 95% [8].

Патофизиологические, патоморфологические и клинические особенности повреждения системы дыхания у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями

Факторы, приводящие к развитию ОРДС, разнообразны; по механизму воздействия их можно разделить на факторы прямого и непрямого повреждающего действия [9, 10]. Особенностью течения ОРДС у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями является полиэтиологичность повреждения легких с признаками одновременно как прямого, так и непрямого воздействия. В качестве этиологических факторов, иногда в совокупности, могут выступать бактерии, вирусы, грибы, препараты химиотерапии, элементы ионизирующей радиации [11]. Специфические причины, которые могут спровоцировать ОРДС у этих пациентов, – лучевая и химиотерапия, лейкостаз в легких при гиперлейкоцитарном синдроме, последствия ТГСК.

Постлучевой пульмонит – повреждение легочной ткани под воздействием высоких доз ионизирующей радиации – встречается в 15,4–61,0% случаев у пациентов, получавших лучевую терапию; у 3,7% из них это осложнение становится причиной смерти в связи с развитием тяжелой формы ОРДС [12]. Особенность ОРДС при постлучевом пульмоните состоит в том, что он может развиваться как сразу после облучения, так и через несколько недель от начала лучевой терапии [13].

У детей с лейкемией развитие тяжелого ОРДС и критической гипоксемии, требующей респираторной поддержки, возможно на фоне лейкостаза в легких, связанного с гиперлейкоцитарным синдромом. Гиперлейкоцитоз характеризуется повышением количества лейкоцитов более $100,0 \times 10^9/\text{л}$ и встречается у 5–20% детей, страдающих лейкемией; чаще наблюдается у пациентов с острой лимфобластной лейкемией [14, 15].

ОРДС у пациентов после ТГСК может быть связан с идиопатической интерстициальной пневмонией (ИИП), которая развивается у 7,3% детей после ТГСК и представляет собой интерстициальное поражение легких, при котором не идентифицирована инфекционная патология. Клинические проявления ИПП варьируют от субклинического синдрома до острой необратимой гипоксемии [16, 17].

«Цитозаровое легкое» – это синдром, развивающийся у 5–20% детей после начала лечения высокими дозами цитозин-арабинозида (АгаС). Клинически он характеризуется появлением одышки, сухого кашля, гипоксемии и других признаков дыхательной недостаточности. На рентгенологической картине легких визуализируются диффузные, двусторонние инфильтративные изменения в виде «снежной бури» или «белого легкого» [18–20].

В основе патогенеза «цитозарового легкого» лежит некардиогенный отек легких, развивающийся вследствие повышенной проницаемости легочных капилляров. Повреждение эндотелия сосудов может происходить в раннем периоде непосредственно под действием АгаС либо через 7–14 дней от начала терапии в результате острого постстрептококкового повреждения эндотелия сосудов, вызванного *St. viridans* [21]. В качестве источника бактериемии выступают некротизированные слизистые ротовой полости и желудочно-кишечного тракта, колонизированные зеленым стрептококком [22].

Таргетная терапия – это современное направление молекулярной медицины, ориентированное на точечное воздействие на конкретные органы или ткани, в частности, на опухолевые клетки. Одна из основных групп таргетных препаратов – моноклональные антитела. Применение этих препаратов при лечении онкогематологических пациентов сопря-

жено с большим количеством различных осложнений, в том числе с развитием интерстициального пневмонита как компонента ОРДС [23]. Частота развития ОРДС при таргетной терапии невысока, но сопровождается высокой летальностью, которая достигает 1,2% [24].

Гистологические отличия ОРДС у онкогематологических пациентов заключаются в диффузном повреждении альвеол с образованием гиалиновых мембран и развитием массивного интерстициального отека, гибелью альвеолярных клеток 1-го типа, пролиферацией фибробластов и миофибробластов, развитием фиброза, что обуславливает более высокую летальность у этих пациентов [25].

Местное воспаление легочной ткани, которое усугубляется высокими пиковыми значениями давления при проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ), приводит к миграции в очаги воспаления макрофагов, нейтрофилов и лейкоцитов с последующим выбросом медиаторов воспаления – интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли (TNF). Поврежденный аэрогематический барьер способствует переходу медиаторов воспаления в кровотоки, приводя к развитию системно-воспалительной реакции и повреждению других органов и систем с развитием синдрома полиорганной недостаточности [26, 27].

Таким образом, сложность лечения ОРДС у этих пациентов обусловлена исходной тяжестью их состояния, полиэтиологичным повреждением аэрогематического барьера и связанных с этими особенностями гистологических изменений, сочетанием синдрома с поражением других органов и систем, сопутствующей иммуносупрессией, молниеносным течением и стертостью клинической картины всех инфекционных процессов. Все эти факторы обуславливают стремительный характер развития ОРДС с быстрым его переходом из одной клинической стадии в другую, что требует принятия срочных мер.

Методы респираторной поддержки при лечении острого респираторного дистресс-синдрома

На сегодняшний день при прогрессии дыхательной недостаточности инвазивная ИВЛ рассматривается как основной метод респираторной поддержки [28]. Трудность обеспечения адекватного газообмена при проведении ИВЛ у пациентов с тяжелым ОРДС обусловлена мозаичностью повреждения легочной ткани с формированием трех функциональных групп альвеол – в зависимости от степени их участия в газообмене. Непосредственно поврежденные участки легких представлены неаэрированными альвеолами, в которых отсутствует газообмен. Зона неповрежденной легочной ткани, которая непосредственно участвует в акте дыхания, представлена гиперэри-

рованными альвеолами. Существуют также плохо вентилируемые, или «хлопающие», альвеолы, газообмен в которых резко снижен [29]. Основная задача при проведении ИВЛ у пациентов с ОРДС – улучшение газообмена за счет увеличения числа вентилируемых альвеол, так как исход заболевания напрямую зависит от объема аэрированных участков легкого [30]. При тяжелом ОРДС для этого требуется респираторная поддержка с очень жесткими параметрами, что может спровоцировать вентилятор-ассоциированное механическое повреждение легких и привести к развитию баро-, волюмо-, ателектотравмы, а также к биологическому повреждению легких с нарушением вентиляционно-перфузионного соотношения и увеличением право-левого шунтирования крови в легких [31].

Вентилятор-ассоциированное повреждение легких обусловлено перераздуванием неповрежденных альвеол, разрушением их аэрогематического барьера, переходом плохо вентилируемых альвеол в разряд невентилируемых, выбросом огромного количества биологически активных веществ, что способствует усугублению тяжести ОРДС [32].

Таким образом, при лечении тяжелой дыхательной недостаточности задача врача интенсивной терапии заключается в том, чтобы, с одной стороны, используя методы ИВЛ, улучшить легочный газообмен и обеспечить приемлемый газовый состав крови, а с другой – минимизировать развитие вентилятор-ассоциированного повреждения легких, а также исключить пагубное влияние механической вентиляции на функционирование других органов и систем [33].

Для предотвращения вентилятор-ассоциированного повреждения легких разработана так называемая стратегия «протективной» ИВЛ, которая основана на данных, полученных в результате крупного многоцентрового рандомизированного исследования ARDS Network. Это исследование показало, что у пациентов с ОРДС ИВЛ с использованием меньших, чем традиционно, дыхательных объемов приводит к снижению летальности на 22% и увеличивает число дней без ИВЛ [34]. Кроме того, при проведении ИВЛ с использованием малых дыхательных объемов в крови и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) отмечено снижение провоспалительных цитокинов, что в свою очередь приводит к минимизации последствий «цитокинового шторма» [35].

В основе «протективной» стратегии ИВЛ лежит принцип обеспечения минимально достаточной оксигенации с использованием малого (не более 6–8 мл/кг идеальной массы тела) дыхательного объема (Vt), минимально достаточного для поддержания альвеол в открытом состоянии, положительного давления в конце выдоха (PEEP) и давления

плато ($P_{plateau}$) менее 30 см вод. ст. [10]. Однако само по себе снижение V_t или увеличение $PEEP$ эффективно только в том случае, если это связано со снижением показателя *driving pressure* (ΔP) [36], отражающего соответствие дыхательного объема, функциональной остаточной емкости легких и зависящего от комплайенса респираторной системы (Crs) и дыхательного объема (V_t): $\Delta P = V_t/Crs$.

Существует прямая зависимость исхода заболевания от значения ΔP : более низкая выживаемость наблюдается среди пациентов с более высоким ΔP , а более высокая выживаемость – среди пациентов с более низким ΔP , независимо от сопутствующих вариаций $PEEP$ и $P_{plateau}$. У пациентов без самостоятельных вдохов ΔP может быть рассчитана как разница между $P_{plateau}$ и $PEEP$ [37].

Существуют и отрицательные стороны использования «протективной» стратегии ИВЛ. При тяжелой форме ОРДС и выраженной гипоксемии использование малых V_t , стремление обеспечить низкие значения ΔP и $P_{plateau}$ приводят к снижению минутного объема вентиляции и, как следствие, к неконтролируемой гиперкапнии. Количество осложнений при данном методе ИВЛ тоже достаточно высокое, а летальность при тяжелых формах ОРДС достигает 16–31%, так как у части пациентов не удается скорректировать критическую гипоксемию никакими традиционными способами ИВЛ [6, 34]. При неэффективности традиционной ИВЛ у пациентов с тяжелым ОРДС возможно использование альтернативных методов оксигенации, таких как высокочастотная искусственная вентиляция легких (ВЧИВЛ), экстракорпоральная мембранная оксигенация (ЭКМО).

ЭКМО – это метод искусственного увеличения уровня парциального напряжения O_2 и снижения CO_2 в крови путем ее прохождения через мембранный оксигенатор и возврат оксигенированной, декарбонированной «артериализованной» крови в системный кровоток [38]. У пациентов с тяжелыми формами ОРДС этот метод позволяет обеспечить достаточную оксигенацию крови и элиминацию CO_2 , увеличивая выживаемость этих пациентов. Исследование CESAR продемонстрировало, что в специализированных центрах терапия ЭКМО может улучшить долгосрочный результат у пациентов с ОРДС, увеличивая выживаемость до 55%. Однако в том же исследовании продемонстрирована 17,8%-я летальность, связанная с развитием различных осложнений, опосредованных самой процедурой ЭКМО [39]. Основные причины летальных исходов, непосредственно связанных с методикой ЭКМО, – инфекционные осложнения и массивные кровотечения, совокупная частота которых достигает 30–48% [40].

Таким образом, использование ЭКМО возможно

не у всех пациентов. К абсолютным противопоказаниям к началу ЭКМО относятся: состояния, при которых противопоказана антикоагулянтная терапия; терминальное состояние; респираторный индекс (paO_2/FiO_2) менее 100 на протяжении 10 дней у детей или 5 дней – у взрослых; синдром полиорганной недостаточности; неконтролируемый метаболический ацидоз; иммуносупрессия; повреждение ЦНС; возраст более 70 лет [41, 42]. Рефрактерная дыхательная недостаточность в первые 6 мес. после аллогенной трансплантации костного мозга также рассматривается как абсолютное противопоказание к ЭКМО (выживаемость < 5%) [43, 44].

Достаточно большая группа пациентов с тяжелыми формами ОРДС требует применения альтернативных методов оксигенации, но имеет относительные или абсолютные противопоказания к экстракорпоральным технологиям – это пациенты с тромбоцитопенией и нейтропенией, пациенты после ТГСК, больные с явлениями полиорганной недостаточности. Применение у них ЭКМО для коррекции артериальной гипоксемии малоэффективно и затратно, сопровождается большим количеством осложнений и высокой летальностью, связанных непосредственно с проведением самой процедуры. Кроме того, ЭКМО – достаточно дорогая, высокотехнологичная процедура; в учреждениях здравоохранения, оказывающих специализированную и первичную медико-санитарную помощь, не всегда есть возможности применять данную методику.

Вопрос о методах поддержания адекватного газообмена у пациентов с тяжелыми формами ОРДС, которым не удается обеспечить адекватную вентиляцию с помощью традиционных методов ИВЛ и которые имеют противопоказания к экстракорпоральным методикам оксигенации, остается актуальным. Для обеспечения вентиляции у этих пациентов применяют альтернативный метод ИВЛ – высокочастотную искусственную вентиляцию легких. Этот термин объединяет различные методы ИВЛ, при которых используют супрафизиологические частоты дыхания (от 1 до 120 Гц) и низкие дыхательные объемы, иногда меньшие, чем объем анатомического мертвого пространства [33]. ВЧИВЛ – достаточно эффективный метод протезирования функции легких у этих пациентов, который обеспечивает адекватную вентиляцию, используя низкие дыхательные объемы, высокое $PEEP$ и низкие значения ΔP , что позволяет избежать вентилятор-ассоциированного повреждения легких.

Основная цель при применении ВЧИВЛ – улучшение газообмена и профилактика вентилятор-ассоциированного повреждения легких путем снижения ΔP и уменьшения $P_{plateau}$ по мере возраст-

тания частоты осцилляций. При частоте 60–100 вдохов/мин происходит сближение показателей P_{mean} и $autoPEEP$ до $\pm 0,2$ см вод. ст. [45]. Использование малых дыхательных объемов, низкие пиковые значения и особенности газообмена делают метод ВЧИВЛ потенциально идеальным режимом для предотвращения вентилятор-ассоциированного повреждения легких и обеспечения адекватной оксигенации у пациентов с тяжелой формой ОРДС.

Современное представление о физиологии газообмена при ВЧИВЛ основано на семи основных механизмах:

- турбулентность в крупных дыхательных путях, вызывающая усиленное перемешивание;
- прямая вентиляция рядом расположенных альвеол;
- турбулентный поток с боковым конвективным перемешиванием;
- *pendelluft* (асинхронный поток между альвеолами из-за разности сопротивлений воздушному потоку);
- смешивание газа из-за разности скоростей в осевом направлении (что приводит к потоку «свежего» газа в направлении альвеол вдоль внутренней части дыхательных путей и потоку «альвеолярного» газа от альвеол вдоль наружной стенки);
- ламинарный поток с боковым переносом путем диффузии (дисперсия Тайора);
- прямая вентиляция через прямые сообщения между соседними альвеолами [46].

Применение изолированной ВЧИВЛ обеспечивает адекватную оксигенацию у пациентов с ОРДС, однако попытки улучшить оксигенацию крови у пациентов с рефрактерной гипоксемией путем увеличения частоты осцилляций более 15 Гц приводят к снижению альвеолярной вентиляции и неуправляемой гиперкапнии [47–49]. Это связано с тем, что эффективность элиминации CO_2 зависит прежде всего от величины V_t , а не от частоты осцилляций. Кроме того, увеличение частоты осцилляций приводит к расширению верхних дыхательных путей, увеличению их объема, что связано с рефлексорной релаксацией мышечного слоя трахеи и высокими значениями $autoPEEP$, а это также сопровождается снижением объема газа, поступающего в дистальные отделы дыхательных путей, и накоплением CO_2 [50, 51]. Понимание патогенеза дыхательной недостаточности и респираторной патофизиологии и стремление минимизировать вентилятор-ассоциированное повреждение легких во время терапии ОРДС и объединить полезные свойства ВЧИВЛ привели к созданию методов респираторной терапии, сочетающих в себе принципы высокочастотной и традиционной ИВЛ.

Значительный интерес при лечении ОРДС у взрослых и детей представляет метод сочетанной высокочастотной струйной ИВЛ (СВСИВЛ), то есть одновременной вентиляции легких двумя потоками – нормочастотным и высокочастотным. Непрерывный высокочастотный поток, который поступает в легкие с большой скоростью и частотой от 80 до 1200 циклов в минуту, накладывается на фазы вдоха и выдоха низкочастотной вентиляции. Низкочастотный поток приводит к фазовым изменениям давления в дыхательных путях, аналогичным обычной вентиляции, и обеспечивает верхний уровень давления, а высокочастотный поток формирует положительное давление в конце выдоха [52].

Впервые такое сочетание методик респираторной терапии предложил *Ш.Э. Атаханов* в 1985 году. Он использовал схему, при которой в адаптер респиратора вставляют канюлю, через которую подают прерывистую струю кислорода, – это приводило к улучшению артериальной оксигенации у большинства больных [53]. Позже, в процессе усовершенствования методики СВСИВЛ, была разработана специальная трехпросветная интубационная трубка, через широкий канал которой подается поток воздуха объемным респиратором и происходит выдох в атмосферу, а через узкий подводится пульсирующий поток от ВЧ-респиратора; третий канал предназначен для измерения давления в просвете трахеи [54]. В основе газообмена при проведении СВСИВЛ лежат те же механизмы, что и при всех режимах ВЧИВЛ, а их сочетание с методом конвекции позволяет устранить серьезное побочное явление, развивающееся при проведении изолированных методов ВЧИВЛ, – неконтролируемую гиперкапнию [55]. Высокоскоростная струя газа в сочетании с высокой частотой осцилляций способствует улучшению оксигенации артериальной крови, что происходит за счет улучшения смешивания газа вдыхаемого объема с газом остаточного объема и равномерного его распределения по всей неповрежденной площади легочной ткани [56].

При изучении влияния метода СВСИВЛ на оксигенацию и вентиляцию оказалось, что увеличение частоты высокочастотных колебаний до 600 мин приводит к более чем 30-кратному снижению V_t и увеличению объема грудной клетки в конце выдоха, что обеспечивает адекватную оксигенацию и вентиляцию даже при низком V_t [57]. В то же время наложение высокочастотного потока на нормочастотный позволяет достичь адекватной элиминации CO_2 и при более высоких значениях частоты дыхания, что значительно улучшает вентиляцию и газообмен [58].

На сегодняшний день СВСИВЛ – относительно новый и не до конца изученный метод при ИВЛ у

пациентов с различной патологией дыхания. Одно из первых клинических исследований эффективности использования СВСИВЛ при тяжелой легочной патологии опубликовано в 1995 году. Авторы показали, что у пациентов с ОРДС при неэффективности традиционных методов ИВЛ переход на СВСИВЛ улучшал оксигенацию, при этом отмечали снижение пикового и среднего давления в дыхательных путях. Исследователи сделали вывод о том, что СВСИВЛ может стать альтернативным режимом вентиляции у критически больных пациентов при неэффективности традиционных методов ИВЛ [59]. В других работах показано, что данный метод можно использовать даже как альтернативу ЭКМО у пациентов с тяжелым ОРДС [60]. По сравнению с ЭКМО он проще в применении, связан с меньшим количеством осложнений, экономически более эффективен, его может использовать в лечебных учреждениях, оказывающих как высокотехнологичную, так и специализированную медицинскую помощь. СВСИВЛ – альтернативный подход к улучшению функции легких и оксигенации у пациентов, страдающих ОРДС [61].

Дальнейшее исследование показало, что СВСИВЛ малыми дыхательными объемами на фоне более высокого среднего давления в дыхательных путях осуществляется в так называемом «окне безопасности» на кривой «давление–объем» и тем самым улучшает рекрутирование альвеол, снижает вероятность их коллабироваия в момент выдоха и предотвращает развитие вентилятор-ассоциированного повреждения легких и внутриальвеолярного отека, обеспечивает более эффективный газообмен. Кроме того, вентиляция с более низкими значениями P_{peak} приводит к снижению транспульмонального давления и незначительно влияет на центральную гемодинамику. При использовании СВСИВЛ не происходит повреждения эпителия альвеол и выброса в системный кровоток медиаторов воспаления, так как вентиляцию проводят с низким ΔP , что предотвращает развитие системного воспалительного ответа.

СВСИВЛ – относительно простой в использовании метод ИВЛ; к его преимуществам можно отнести также отсутствие герметичности системы, что обеспечивает отличную синхронизацию пациента с респиратором; возможность санации верхних дыхательных путей, не прекращая вентиляцию легких; уменьшение сброса газа при негерметичных легких; возможность обеспечивать адекватный газообмен при низких значениях P_{peak} [50]. Еще одна особенность СВСИВЛ – улучшение отделения мокроты от слизистой дыхательных путей и облегчение ее эвакуации из альвеолярного пространства, что увеличивает количество аэрированных альвеол. Это обусловлено воздействием пульсирующих импульсов и разностью давления между

альвеолярным пространством и верхними дыхательными путями [31].

До недавнего времени применение СВСИВЛ было ограничено по нескольким причинам. Во-первых, отсутствовал аппарат ВЧИВЛ, который сочетал бы в себе возможности использования одновременно низкочастотного и высокочастотного режимов. Во-вторых, не была решена проблема адекватного увлажнения и согревания газовой смеси. С развитием современных технологий обе эти проблемы решены.

Среди недостатков СВЧИВЛ можно отметить сложность измерения дыхательного объема, минутной вентиляции и остаточной емкости легких, поскольку вентиляция проводится по открытому контуру, и объем газа, поступающий из инжекторной канюли, не соответствует дыхательному объему, представленному в легких [58]. При длительной СВСИВЛ возможно также развитие воспаления слизистой трахеи с переходом в некротический трахеобронхит, что обусловлено высоким потоком газовой смеси, неэффективным ее увлажнением и согреванием. Правильное увлажнение газа в современных аппаратах ВЧИВЛ снижает вероятность данного осложнения [62, 63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Особенности патогенеза, патоморфологии, тяжесть и быстрота развития клинической картины ОРДС у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями, бесперспективность использования у них экстракорпоральных методик оксигенации заставляют искать альтернативные методы респираторной поддержки, которые могли бы обеспечить адекватный газообмен у этих пациентов. Имеющиеся исследования дают основания считать, что для больных с тяжелыми заболеваниями легких и низкой податливостью легочной ткани СВСИВЛ – более эффективный метод по сравнению с традиционной ИВЛ и другими способами высокочастотной вентиляции, так как позволяет снизить ΔP и проводить вентиляцию с $V_t < 3$ мл/кг, обеспечивая адекватную вентиляцию и оксигенацию.

Возможно, СВСИВЛ найдет применение при лечении ОРДС у пациентов с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями, так как эти пациенты фактически не имеют другой альтернативы традиционной ИВЛ в случае ее неэффективности. Тем не менее проведенные исследования не позволяют сделать окончательный вывод об эффективности данного метода ИВЛ при лечении ОРДС. Нет ни одной работы, в которой описаны возможности СВСИВЛ при лечении ОРДС у детей с онкогематологическими и иммунологическими заболеваниями. Необходимы дополнительные изыскания в этом направлении.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

ORCID

Ivanashkin A.Y. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4348-4573>

Lazarev V.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8417-3555>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

Литература

1. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Самочатова Е.В. Сопроводительная терапия и контроль инфекций при гематологических и онкологических заболеваниях. – М.: Медпрактик; 2008.
2. Garner J.S., Jarvis W.R., Emori T.G., Horan T.C., Hughes J.M. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16 (3):128–40.
3. Barzilai A. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 26–29 September 1999, San Francisco. *Isr Med Assoc J* 2000; 2 (4): 332–3.
4. Oppenheim B., Anderson H., Freifeld A., Marchigiani D., Walsh T., Chanock S., et al. Management of febrile neutropenia in low risk cancer patients A double-blind comparison of empirical oral and intravenous antibiotic therapy for low-risk febrile patients with neutropenia during cancer chemotherapy. *Thorax* 2000; 55 (1): 63–9.
5. Лабинская А.С. Руководство по медицинской микробиологии. – М.: Бином; 2014.
6. Phua J., Badia J.R., Adhikari N. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179 (3): 220–7.
7. DeBruin W., Notterman D., Magid M., Godwin T., Johnston S. Acute hypoxemic respiratory failure in infants and children: clinical and pathologic characteristics. *Crit Care Med* 1992; 20 (9): 1223–34.
8. Vojko T., Notterman D., Greenwald B., De Bruin W., Magid M., Godwin T. Acute hypoxemic respiratory failure in children following bone marrow transplantation: an outcome and pathologic study. *Crit Care Med* 1995; 23 (4): 755–9.
9. Atabai K., Matthay M. The pulmonary physician in critical care 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: Definitions and epidemiology. *Thorax* 2002; 57 (5): 452–8.
10. Власенко А.В., Гаврилин С.В., Гельфанд Б.Р., Еременко А.А., Заболотских И.Б., Зильбер А.П. и соавт. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома. Клинические рекомендации 2015; 1–38. <http://www.far.org.ru/recomendation>
11. Сотников А.В. Жизнеугрожающие осложнения у детей после химиотерапии по поводу онкологических заболеваний / Дисс. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук. – М.: ФГБУ Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина, 2014.
12. Семищева Н.Л., Карапетян Е.И., Мальцев Т.А. Постлучевой пневмонит в практике пульмонолога. Бюллетень физиологии и патологии дыхания 2014; 53: 137–42.
13. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Самочатова Е.В. Сопроводительная терапия и контроль инфекций при гематологических и онкологических заболеваниях. – М., 2008. Вып. Медпрактик, 448 с.
14. Румянцев А.Г., Самочатова Е.В. Практическое руководство по детским болезням. Гематология/онкология детского возраста, т. 4. – М.: ИД Медпрактика, 2004.
15. Lichtman M.A., Rowe J.M. Hyperleukocytic leukemias: rheological, clinical, and therapeutic considerations. *Blood* 1982; 60: 279.
16. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. – М.: Медицинское информационное агентство; 2003.
17. Kantrow S.P., Hackman R.C., Bockh M. Idiopathic pneumonia syndrome: changing spectrum of lung injury after marrow transplantation. *Transplantation* 1997; 63 (8): 1079–86.
18. Tham R. Pulmonary Complications of Cytosine-Arabinoside Therapy: radiographic findings. *AJR Am J Roentgenol* 1987; 149 (1): 23–7.
19. Shearer P., Shearer P., Katz J., Bozeman P., Jenkins J., Laver J., et al. Pulmonary insufficiency complicating therapy with high dose cytosine arabinoside in five pediatric patients with relapsed acute myelogenous leukemia. *Cancer* 1994; 74 (7): 1953–8.
20. Andersson B.S., Cassian Y., Keating M.J. Fatal pulmonary failure complicating high-dose cytosine arabinoside therapy in acute leukemia *Cancer* 1990; 65 (5): 1079–84.
21. Kern W., Kurrle E., Vanek E. High risk of streptococcal septicemia after high dose cytosine arabinoside treatment for acute myelogenous leukemia. *Klin Wochenschr* 1987; 65 (16): 773–80.
22. Marron A., Carratala J. Serious complications of bacteremia caused by Viridans streptococci in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2000; 31 (5): 1126–30.
23. Arora R., Kisiel M., Maccoll C. Panitumumab-induced pulmonary toxicity 2019; 26 (5): 700–2.
24. Ishiguro M., Watanabe T., Yamaguchi K., Satoh T., Ito H., Seriu T., et al. A Japanese post-marketing surveillance of cetuximab (Erbixw®) in patients with metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42 (4): 287–94.
25. Thille A.W., Esteban A., Fernández-Segoviano P., Rodriguez J.-M., Aramburu J.-A., Vargas-Errazuriz P., et al. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: A prospective cohort study of clinical autopsies. *Lancet Respir Med* 2013; 1 (5): 395–401.
26. Curley G.F., Laffey G.J., Zhang H., Arthur S., Slutsky S.A. Biotrauma and Ventilator-Induced Lung Injury: Clinical Implications. *Chest Elsevier Inc* 2016; 150 (5): 1109–17.
27. Tremblay L., Valenza F., Ribeiro S.P., Li J., Slutsky A.S. Injurious ventilatory strate-

- gies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997; 99 (5): 944–52.
28. Ranieri V., Rubenfeld G. Acute Respiratory Distress Syndrome. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*. JAMA 2012; 307 (23): 2525–33.
 29. Sakr Y., Vincent J.L., Reinhart K., Groeneveld J., Michalopoulos A., Sprung C.L., et al. High tidal volume and positive fluid balance are associated with worse outcome in acute lung injury. *Chest The American College of Chest Physicians* 2005; 128 (5): 3098–108.
 30. Gattinoni L. Lung Recruitment in Patients with the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2006; 354 (17): 1609–19.
 31. Кассиль В.Л., Выжигина М.А. Искусственная и вспомогательная вентиляция легких. Руководство для врачей. – М.: Медицина; 2004.
 32. Nieszkowska A., Lu Q., Vieira S., Elman M., Fetita C., Rouby J.J., et al. Incidence and regional distribution of lung overinflation during mechanical ventilation with positive end-expiratory pressure. *Crit Care Med* 2004; 32 (7): 1496–503.
 33. Михельсон В.А., Гребенникова В.А. Анестезиология и интенсивная терапия в педиатрии. – М.: МЕДпресс-информ; 2009.
 34. Brower R.G., Matthay M.A., Morris A., Schoenfeld D., Thompson B.T., Arthur Wheeler A. ARDS Network. Ventilation With Lower Tidal Volumes As Compared With Traditional Tidal Volumes for ALI and the ARDS. *N Engl J Med* 2000; 342 (18): 1301–8.
 35. Ranieri V.M., Suter P.M., Tortorella C., De Tullio R., Dayer M.J., Brienza A., et al. Effect of Mechanical Ventilation on Inflammatory Mediators in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA* 1999; 281 (1): 54–61.
 36. Marcelo B.P., Maureen O.M., Slutsky A.S. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2014; (372) 8: 747–55.
 37. Laffey J., Bellani G., Pham T., Fan E., Madotto F., Bajwa E., et al. Potentially modifiable factors contributing to outcome from acute respiratory distress syndrome: the LUNG SAFE study. *Intensive Care Med* Springer Berlin Heidelberg 2016; 42 (12): 1865–76.
 38. Периферическая вено-артериальная экстракорпоральная мембранная оксигенация перед трансплантацией сердца. Клинические рекомендации. Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество» – М., 2015.
 39. Peek G.J., Mugford M., Tiruvoipati R. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Elsevier Ltd* 2009; 374 (9698): 1351–63.
 40. Lindén V.B., Lidégran M.K., Frisén G. ECMO in ARDS: A long-term follow-up study regarding pulmonary morphology and function and health-related quality of life. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53 (4): 489–95.
 41. Schmidt M., Bailey M., Sheldrake J. Predicting survival after extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory failure: The Respiratory Extracorporeal Membrane Oxygenation Survival Prediction (RESP) score. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189 (11): 1374–82.
 42. Enger T.B., Philipp A., Videm V. Prediction of mortality in adult patients with severe acute lung failure receiving veno-venous extracorporeal membrane oxygenation: A prospective observational study. *Crit Care* 2014; 18 (2): 67.
 43. MacLaren G. When to initiate ECMO with low likelihood of success. *Crit Care* 2018; 22 (1): 12–4.
 44. Gupta M., Shanley T.P., Moler F.W. Extracorporeal life support for severe respiratory failure in children with immune compromised conditions. *Pediatr Crit Care Med* 2008; 9 (4): 380–5.
 45. Конторович М.Б. Физиологические эффекты и клиническое применение высокочастотной струйной ИВЛ / Дисс. на соиск. учен. степ. док. мед. наук. – Екб.: ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, 2012.
 46. Slutsky A.S., Drazen J.M. Ventilation with small tidal volumes. *New England Journal of Medicine* 2002; 347 (9): 630–31.
 47. Biro P., Wiedemann K. Jetventilation und Anästhesie für diagnostische und therapeutische Eingriffe an den Atemwegen. *Anaesthesist* 1999; 48 (9): 669–85.
 48. Lin E.S., Jones M.J., Mottram S.D., Smith B.E., Smith G. Relationship between resonance and gas exchange during high frequency jet ventilation. *Br J Anaesth Oxford University Press* 1990; 64 (4): 453–9.
 49. Rouby J., Fuscuardi J., Bourgain J., Viars P. High-frequency jet ventilation in postoperative respiratory failure: determinants of oxygenation. *Anesthesiology* 1983; 59 (4): 281–7.
 50. Акалаев П.Н., Сабиров Д.М. Высоко-частотная вентиляция легких: новое – это хорошо забытое старое. *Вестник экстренной медицины* 2013; 4: 27–9.
 51. Brusasco V., Knopp T.J., Rehder K. Gas transport during high-frequency ventilation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1983; 55 (2): 472–8.
 52. Friedrich G., Mausser G., Gugatschka M. Die Jet-Ventilation in der operativen Laryngologie. *Jet ventilation in laryngotracheal surgery*. *HNO* 2008; 56 (12): 1197–206.
 53. Атаханов Ш.Э. Способ сочетанной традиционной высокочастотной искусственной вентиляции легких. *Анестезиология и реаниматология* 1985; 4: 27–9.
 54. Zeravik J., Pfeiffer U.J. Efficacy of high frequency ventilation combined with volume controlled ventilation in dependency of extravascular lung water. *Acta Anaesthesiol Scand* 1989; 33 (7): 568–74.
 55. Chakrabarti M.K., Loh L., Gilchrist I. High Frequency Ventilation and Gas Diffusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 1984; 28 (5): 544–8.
 56. Kirby R. High-frequency positive-pressure ventilation (HFPPV): what role in ventilatory insufficiency? *Anesthesiology* 1980; 52 (2): 109–10.
 57. Sütterlin R., LoMauro A., Gandolfi S., Priori R., Aliverti A., Frykholm P., et al. Influence of tracheal obstruction on the efficacy of superimposed high-frequency jet ventilation and single-frequency jet ventilation. *Anesthesiology* 2015; 123 (4): 799–809.
 58. Sutterlin R., Priori R., Larsson A., LoMauro A., Frykholm P., Aliverti A.

- Frequency dependence of lung volume changes during superimposed high-frequency jet ventilation and high-frequency jet ventilation. *Br J Anaesth Elsevier* 2014; 112 (1): 141–9.
59. Schragl E., Donner A., Kashanipour A., Aloy A. Preliminary experiences with superimposed high-frequency jet ventilation in intensive care. *Anaesthesist* 1995; 44 (6): 429–35.
60. Bingold T., Scheller B., Wolf T., Meier J., Koch A., Zacharowski K., et al. Superimposed high-frequency jet ventilation combined with continuous positive airway pressure/assisted spontaneous breathing improves oxygenation in patients with H1N1-associated ARDS. *Ann Intensive Care* 2012; 2 (1): 1–5.
61. Davies A.R., Angus D.C. Extracorporeal membrane oxygenation for 2009 influenza A(H1N1) acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2009; 302 (17): 1888–95.
62. Chung K., Wolf S., Renz E., Allan P., Aden J., Merrill G., et al. High-frequency percussive ventilation and low tidal volume ventilation in burns: A randomized controlled trial. *Crit Care Med* 2010; 38 (10): 1970–7.
63. Kraincuk P., Kepka A., Ihra G., Schabernig C., Aloy A. A new prototype of an electronic jet-ventilator and its humidification system. *Crit Care* 1999; 3 (4): 101–10.

Правила оформления статей

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, 1,5 интервала.

2. На 1-й странице: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждений, в которых выполнена работа, их полный адрес с индексом.

В конце статьи: контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, факс, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание авторов.

3. Объем статей: оригинальная – не более 12 стр.; описание наблюдений, заметки из практики – не более 5 стр.; обзор литературы – до 20 стр.

К статье должно быть приложено 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 и т.д.). 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 и снабжены подрисуночными подписями на отдельном листе, фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи;
- все таблицы пронумерованы, иметь название; все сокращения расшифрованы в примечании к таблице;
- ссылки на таблицы, рисунки и др. иллюстративные материалы приводятся по тексту статьи в круглых скобках.

5. Единицы измерений даются в СИ.

Аббревиатуры в тексте полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование необщепринятых сокращений не допускается. Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. Список цитируемой литературы:

- список ссылок в порядке цитирования; все источники пронумерованы, их нумерация должна строго соответствовать нумерации в тексте статьи;
- для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 6, указывают первые 6, далее «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте);
- при ссылке на статьи из журналов указывают название статьи; журнала, год, том, номер выпуска, страницы;
- при ссылке на монографии указывают полное название книги, место издания, название издательства, год издания;
- при ссылке на авторефераты диссертаций – 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.

Электронная почта: journal@fnkc.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-131-138

Патологии системы комплемента

А.А. Бутылин¹, А.Е. Филиппова², С.С. Шахиджанов², Ф.И. Атауллаханов^{1, 2, 3, 4}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 ФГАУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва

Система комплемента – часть иммунной системы, которая обеспечивает защиту организма от вторжения чужеродных патогенов. Различного рода нарушения этой системы могут способствовать развитию ряда тяжелых заболеваний. В данном обзоре описаны различные нарушения в работе системы комплемента, а также показано, к каким патологиям это может привести.

Ключевые слова: система комплемента, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, атипичный гемолитико-уремический синдром, возрастная макулодистрофия, дефициты системы комплемента, ангионевротический отек

Бутылин А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 131–138.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-131-138

© 2020 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 04.07.2019

Принята к печати 19.08.2019

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

Pathologies of the complement system

A.A. Butilin¹, A.E. Filippova², S.S. Shakhidzhanov², F.I. Ataulakhonov^{1, 2, 3, 4}¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow² Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow³ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow⁴ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

Complement system is a part of the immune system that provides organism cells with protection against foreign pathogens. Various kinds of defects in the complement system can induce development of serious diseases. This review summarizes different malfunctions of the complement system and also shows how these defects can result in development of severe diseases.

Key words: complement system, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, atypical hemolytic uremic syndrome, age-related macular degeneration, complement system deficiency, angioedema

Butilin A.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 131–138.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-131-138

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 04.07.2019

Accepted 19.08.2019

Correspondence:

Shakhidzhanov S. Soslan, scientist, Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences.

Address: Russia 119991, Moscow, Kosygina st., 4

E-mail: shakhidzhanov.s@yandex.ru

Система комплемента – это часть нашей иммунной системы, которая представляет собой связующее звено между врожденным и приобретенным иммунитетом и состоит более чем из 40 разных белков, одна их часть растворена в плазме крови, а другая экспрессируется на поверхности клеток организма. При попадании патогенных клеток или частиц в организм начинается активация этой системы и запускается каскад биохимических реакций, в норме позволяющий наработать огромное количество фрагментов белков системы комплемента, которые опсонизируют мембрану патогена. В конце каскада происходит образование отверстий – мембраноатакующих комплексов – на поверхности этих патогенов, что приводит к их гибели.

Для своевременной защиты необходимо, чтобы эта система реагировала очень быстро и слаженно и активировалась именно на мембранах чужеродных агентов, не задевая при этом клетки организма. Существует много патологий различной этиологии, в которых задействована система комплемента. В данном обзоре мы рассмотрим различные наруше-

ния в этой системе, а также причины, по которым такие нарушения приводят к развитию ряда патологий.

Заболевания, связанные с системой комплемента. В действующей Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) не без труда можно найти всего одну строку, посвященную системе комплемента, – в разделе «Заболевания крови и т.д. Другие иммунодефициты» – с формулировкой: «Дефект в системе комплемента», то есть подразумевается, что за формирование патологии в этой системе «отвечает» только один дефект [1].

В МКБ-11, которая вступит в действие в 2022 году, спектр патологических состояний, связанных с иммунной системой, значительно расширен. Принципиальным стало появление отдельного класса заболеваний – «04. Нарушения иммунной системы», где в подклассе «Первичные иммунодефициты. Нарушения врожденного иммунитета» есть раздел, который отличается от строчки в МКБ-10 всего на одну букву, – «Дефекты в системе комплемента» [2]. При этом имеются в виду несколько дефицитов внутри функ-

циональных блоков или дефициты отдельных компонентов. Как правило, под дефицитами понимают такие дефекты белков (как отражение генетического полиморфизма), которые ведут к снижению их функциональных возможностей (хотя описаны и обратные ситуации [3]).

В МКБ-11 выделяют дефициты функциональных блоков – так называемые «ранние» компоненты классического пути активации системы комплемента (C1q, C1r, C1s, C4, C2) – те, которые находятся «выше» уровня C3 и формируют C3-конвертазу, и дефициты «поздних» компонентов (C5–C9), формирующих мембраноатакующий комплекс.

Отдельно выделяют дефициты факторов В и D, а также наследственную и приобретенную ангиодистрофию (такой термин употреблен в официальном русском переводе [2], хотя в англоязычной версии распространен термин «*Hereditary (acquired) angioedema*» – врожденный (приобретенный) ангионевротический отек). Все остальные дефекты объединены в обычную для любой классификации категорию – «другие».

Охарактеризуем кратко эти дефициты, отметив, что первичный дефицит компонентов комплемента встречается в среднем с частотой около 1% от общего количества первичных иммунодефицитов [4].

Дефициты и «ранних», и «поздних» компонентов наследуются по аутосомно-рецессивному типу; у гетерозигот уровень дефектного белка может составлять около 50% от нормы. Дефицит C2 – наиболее частый (1% гетерозигот в популяции; у японцев – 2% по C1q).

Полный (гомозиготный) дефицит «поздних» компонентов приводит к полному отсутствию литической активности (не формируется мембраноатакующий комплекс – МАК) и резкому увеличению частоты генерализованных нейссерийных инфекций, в первую очередь менингококковой. В среднем эта частота варьирует от 1 до 1000 на 1 млн населения в год, при этом более 50% таких пациентов болеют генерализованной формой хотя бы раз в жизни, а многие – до 3–6 раз, причем в зрелом возрасте. Другая особенность такой инфекции у лиц с дефицитами C6–C8 – сравнительно легкое течение и отсутствие летальных исходов.

При гомозиготном дефиците C9 и гетерозиготных дефицитах C5–C8 литическая активность составляет 30–60% от нормы, при этом монодефицит C9 может приводить к генерализованной менингококковой инфекции, а достаточно распространенные гетерозиготные дефициты остальных «поздних» факторов, как правило, не приводят. У лиц с гомозиготным дефицитом C5–C8 не удается обнаружить достоверно повышенную подверженность иным бактериальным инфекциям, а также каким-либо сома-

тическим заболеваниям. Резистентность этих лиц к менингококкам может быть повышена с помощью вакцинации [5].

При врожденных гомозиготных дефицитах «ранних» компонентов (C1, C4, C2) производство МАК может быть запущено по альтернативному и/или лектиновому пути; вероятность нейссерийных инфекций у таких пациентов гораздо ниже, чем у лиц с дефицитом «поздних» компонентов. Однако у них поврежденной, менее избирательной, но не менее важной антибактериальной механизм – фагоцитоз, опосредованный комплементом, в первую очередь связавшимся с бактериями компонентом C3b. По этой причине они подвержены частым инфекционным заболеваниям, которые могут быть вызваны различными грамположительными или грамотрицательными микроорганизмами и проявляются местными нагноениями, реже – генерализуются (сепсис, менингит и т.п.). При своевременном лечении эти инфекции не угрожают жизни пациентов, но существенно снижают качество их жизни. При отсутствии лечения эти пациенты умирают от менингита, сепсиса или пневмонии, вызванных наиболее распространенными патогенами – *S. pneumoniae*, *H. Influenzae* (тип b), *N. meningitidis* и др., в связи с чем показана иммунизация [6].

Другая группа патологий, прочно ассоциирующихся с дефектами «ранних» компонентов, принимающих участие в элиминации иммунных комплексов, – иммунокомплексные заболевания. В 70–90% случаев это так называемые СКВ-подобные заболевания (СКВ – системная красная волчанка) и гломерулонефрит, патогенез которых пока весьма далек от понимания [7].

Гомозиготный дефицит C1q более чем в 90% случаев приводит к СКВ – это наиболее выраженный генетический фактор риска ее развития. По сравнению с «классической» СКВ такое СКВ-подобное заболевание развивается в более раннем возрасте, протекает тяжелее, с большим вовлечением кожных покровов и центральной нервной системы, хуже поддается лечению стероидами. До 20–40% C1q-дефицитных пациентов умирают в раннем возрасте от инфекций или осложнений СКВ [8, 9].

Дефицит компонента C4 имеет свои особенности. В геноме человека присутствуют два гомологичных гена – *C4A* и *C4B*, кодирующих белки C4A и C4B (это не имеет отношения к анафилатоксину C4a и фрагменту C4b), первый из которых лучше связывается с белками, а второй – с углеводами. Полный дефицит C4 (с 4 дефектными аллелями) редок, но в 50% случаев приводит к СКВ. Напротив, дефицит только компонента C4A встречается с частотой около 1% в популяции в целом и до 15% среди лиц с СКВ. Активность C4 при таком дефиците отчасти сохраняется, поэтому течение СКВ сравнительно благоприятное.

Дефицит C4B чаще сопровождается бактериальными инфекциями [10].

Гетерозиготный дефицит C2 встречается примерно у одного из 100 европейцев, а гомозиготный – в соотношении 1:10000 и может проявляться СКВ-подобным заболеванием, но лишь у 10% лиц, гомозиготных по дефектному аллелю.

Механизм развития СКВ при дефицитах «ранних» компонентов, видимо, общий: во-первых, без включения компонентов комплемента в состав иммунных комплексов они не переходят в растворимое состояние, оседая на стенках сосудов и провоцируя аутоиммунные реакции. Во-вторых, нарушен механизм очистки от остатков апоптотических клеток, которые могут выступать как аутоантигены. В зависимости от изучаемой популяции СКВ-подобное заболевание развивается у 30–70% лиц с дефицитами «ранних» компонентов, и наоборот, среди больных СКВ выявляют от 1 до 20% лиц с такими дефицитами [11].

Дефициты факторов В и D альтернативного пути обнаруживают настолько редко, что каждый из них становится предметом детального исследования и отдельного клинического сообщения. Гомозиготные дефициты по фактору В не описаны в литературе, а гомозиготные дефициты по фактору D выявлены разными исследователями – всего порядка 10 случаев. Чаще встречается дефицит пропердина (описаны более 50 случаев такого гомозиготного дефицита). Все они приводят к резко повышенной заболеваемости генерализованными формами менингококковой инфекции, которая, однако, протекает иначе, чем в случае дефицита «поздних» компонентов комплемента. Лица с полным дефицитом по одному из компонентов альтернативного пути болеют тяжело (вплоть до летальных исходов), но, как правило, в раннем детстве и однократно. Это означает, что первая встреча с менингококком у таких лиц не всегда приводит к заболеванию (возможно, за счет протективного эффекта фагоцитоза). Повторные встречи менее опасны, поскольку выработанные ранее антитела активируют неповрежденный классический путь и наработку МАК [12]. При этом лица с гетерозиготным дефицитом компонентов альтернативного пути демонстрируют высокую заболеваемость инкапсулированными инфекциями с тяжелыми клиническими формами (пневмония, эмпиема, перитонит) [13].

Наследственный (или приобретенный) ангионевротический отек (НАО) – едва ли не самое известное в этой области заболевание, описанное еще Гиппократом. В его основе лежит любая форма функциональной недостаточности ингибитора компонента C1 (C1-ингибитора, C1-inh). В англоязычной литературе употребляются термины «*Hereditary angioedema*»

(или C1-inh-HAE; частота встречаемости – около 1:50000) и «*acquired angioedema*» (C1-inh-AAE; около 1:500000).

C1-ингибитор (альфа-2-глобулин, относится к суперсемейству серпинов, G-тип) синтезируется в основном в печени и блокирует активность компонентов комплекса C1 (C1r и C1s), препятствуя дальнейшей активации классического пути, в частности, расщеплению компонентов C2 и C4. Помимо белка C1, у C1-ингибитора обнаружены следующие «мишени»:

- ингибирование компонентов лектинового пути (MASP-1, MASP-2);
- ингибирование факторов свертывания крови XIa и XIIa;
- ингибирование превращения плазминогена в плазмин;
- ингибирование активированного калликреина.

Последнее обстоятельство имеет ключевое патогенетическое значение. При дефиците C1-ингибитора увеличивается содержание калликреина, что приводит к образованию брадикинина. Активация «ранних» компонентов комплемента также ведет к повышению продукции вазоактивных пептидов, а все вместе – к повышению проницаемости капилляров и экстравазации плазмы, то есть к локальному отеку, а также спазму гладкой мускулатуры пищеварительного тракта и полых органов. Отек гортани при отсутствии лечения в 25% случаев приводит к летальному исходу.

Известны три молекулярных дефекта, приводящие к НАО, которые клинически неразличимы:

- НАО I типа (80–90% случаев): вызван делецией или усеченной транскрипцией; аутосомно-доминантный (в основном – гетерозиготы); результат – количественный дефицит C1-inh, уровень которого около 25–30% нормы при определении иммунологическими методами (в русскоязычной литературе употребляется термин «истинный ангионевротический отек») [14];
- НАО II типа (15%): вызван точечными мутациями в гене; результат – структурный дефект со снижением функциональной активности при нормальном или повышенном уровне C1-inh (в русскоязычной литературе – «вариантный ангионевротический отек»);
- НАО III типа (1–5%): большинство исследователей предполагает, что тип III связан не с дефицитом C1-inh, а скорее, с повышенной активацией кининогена – предшественника брадикинина; в некоторых случаях удается связать этот тип НАО с активностью фактора XIIa; этот тип чаще встречается у женщин, принимающих пероральные контрацептивы на основе эстрогенов; при этом типе НАО уровни C1-ингибитора и C4 – в норме [15].

Более редкая форма – приобретенный ангионевротический отек – возникает как вторичное осложнение на фоне серьезного заболевания – как правило, опухолевого, часто – лимфопролиферативного, когда формируются антитела к нормальному C1-ингибитору.

Современные препараты, эффективные при купировании отеков, блокируют основное патогенетическое звено – систему «калликреин–брадикинин». В 2018 году FDA одобрило блокирующее человеческое моноклональное антитело против калликреина (препарат Ланаделумаб, *Dyax Corp*, США). В Европе применяют препарат, блокирующий V2-рецепторы к брадикинину, – Фиразир (икатибант, *SHIRE Orphan Therapies GmbH*, Германия) – это синтетический декапептид, стоимость которого составляет от 50 до 120 тыс. руб. за одно введение. В острых ситуациях применяют также свежемороженную плазму, очищенный из плазмы или рекомбинантный препарат C1-inh из молока трансгенных кроликов *Ruconest* (оба не зарегистрированы в России) [14].

Рассмотренные выше дефициты основных компонентов системы комплемента имеют вполне ожидаемую связь с соответствующими клиническими проявлениями: недостаток или дефект белка ведет к ослаблению того или иного пути активации (реже – к патологическому усилению в ущерб конечному результату) и, в конце концов, к снижению эффективности системы врожденного иммунитета [16].

Наряду с этой «классической» схемой в последнее время сформировалось представление о болезнях, ассоциируемых с системой комплемента, вызванных нарушением регуляторных взаимодействий, которые в англоязычной литературе получили название «*diseases of complement dysregulation*» [17]. Появление этого термина связано в том числе и с тем, что за последние 10–12 лет число известных заболеваний, в которых, как было установлено, принимают участие белки системы комплемента, как минимум удвоилось. На сегодняшний день в этом списке насчитывается порядка 40 наименований нозологий, патологических состояний и процессов: это не только уже известные заболевания, связанные с аутоиммунитетом и комплементом, такие как ангионевротический отек, атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС), тромботическая микроангиопатия, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), СКВ, антифосфолипидный синдром и др., где воспаление – ведущий синдром, но также заболевания и патологические состояния, которые до последнего времени никак не ассоциировались с нарушениями в работе системы комплемента, а трактовались как метаболические нарушения или дегенеративные изменения – политравма, атеросклероз, деменция, глаукома, инфаркт миокарда, инсульт, синдром реперфузии,

болезнь Крона, увеит, астма, проведение гемодиализа и др. [18]. Для некоторых патологий участие системы (или ее компонентов) уже доказано, в отношении других сделаны обоснованные предположения.

С точки зрения динамики системы комплемента, наибольшие проблемы в большинстве случаев вызывает ее слабая, избыточная или несвоевременная активация по одному или нескольким путям, а также нарушения, приводящие к атаке на собственные клетки организма. В известном смысле рассмотренный выше ангионевротический отек (дефицит ингибитора компонента C1) можно рассматривать как пример нарушения регуляции. Наиболее яркие представители «болезней регуляции комплемента» – аГУС, ПНГ, возрастная макулодистрофия (ВМД).

Атипичный гемолитико-уремический синдром.

«Типичный» гемолитико-уремический синдром (ГУС, синдром Гассера) – состояние, включающее триаду симптомов: гемолитическую анемию, тромбоцитопению и поражение почек с развитием острой почечной недостаточности. Молекулярная его причина установлена в 1950-е годы – это прямое воздействие шига- или шигаподобного токсина энтеробактерий на эндотелий почечных капилляров с развитием тромботической микроангиопатии, которая приводит к микротромбозам, потреблению тромбоцитов и развитию почечной недостаточности, часто протекающей на фоне разнообразной полиорганной патологии.

Атипичный ГУС характеризуется точно такой же триадой, но имеет более тяжелое течение с поражением практически всех органов и весьма неблагоприятным исходом (умирают до 10% больных, примерно у 30% первая атака заканчивается терминальной почечной недостаточностью). Возможность существования «параллельного» синдрома, формирующегося без участия инфекции, была показана, когда выяснилось, что дефицит металлопротеиназы ADAMTS-13 (первичный генетический или вторичный за счет аутоантител), расщепляющей фактор фон Виллебранда, может приводить к важнейшему признаку классического ГУС – тромботической микроангиопатии и на ее основе – к тромботической тромбоцитопенической пурпуре (порог активности ADAMTS-13 в плазме оценивается примерно в 10% нормы) [19].

Ситуация с ADAMTS-13 могла показаться, скорее, исключением, если бы со стороны системы комплемента не пришло второе подтверждение. Оказалось, что самые разные нарушения регуляции ее активации по альтернативному пути – факторы высокого риска возникновения аГУС [20]. Показано, что чаще всего аГУС – это результат недостаточного контроля постоянной активации системы комплемента по альтернативному пути, при этом детальная

молекулярная картина зависит от того, какой именно белок-регулятор (*complement control protein* – ССР) пострадал. В зависимости от этого различают несколько патогенетических вариантов аГУС:

- аГУС с аномалией фактора В (1–4% мутаций в гене, ведущих к аГУС; фактор В принимает непосредственное участие в активации альтернативного пути комплемента) [21];
- аГУС с аномалией фактора С3 (2–10% мутаций в гене, ведущих к аГУС; С3 – ключевой белок системы комплемента, некоторые его мутации сопровождаются так называемым «усилением функции», в результате С3 хуже, чем в норме, связывается с МСР (CD46) – *membrane cofactor protein*, из-за этого фактор В образует с С3b больше комплексов, увеличивая время жизни (количество) С3b-конвертазы);
- аГУС с дефицитом DGKE (диацилглицеролкиназа-эпсилон – фермент, фосфорилирующий диацилглицерол; дефицит DGKE в клетках эндотелия приводит к увеличению времени жизни DAG – диацилглицерола – и переактивации протеинкиназы С РКС, увеличивая синтез и выброс в плазму протромботических факторов);
- аГУС с аномалией фактора Н (один из основных ингибиторов альтернативного пути; до 20–30% пациентов имеют мутации в этом гене, ведущие к аГУС; описано порядка 300 таких мутаций, происходящих в основном на 19–20-й домены, связывающих сиаловые кислоты на поверхности собственных клеток);
- аГУС с аномалией фактора I (4–10% пациентов с мутациями, ведущими к аГУС; у половины пациентов с этим вариантом аГУС наступает терминальная почечная недостаточность);
- аГУС с антителами против фактора Н (такие антитела имеют 6–10% пациентов; при раннем лечении исход благоприятный);
- аГУС с аномалией тромбомодулина (3–5% пациентов с аГУС имеют мутации в этом гене; тромбомодулин связывается с С3b и фактором Н, ускоряя процесс инактивации С3b фактором I);
- аГУС с аномалией МСР (CD46) (*membrane cofactor protein*; у 5–15% пациентов описано более 60 мутаций, ведущих к аГУС; у таких пациентов функция почек, как правило, сохраняется) [17, 22].

Все эти варианты аГУС – по сути варианты увеличения производства С3b в альтернативном пути одновременно со снятием защиты с собственных клеток организма всеми доступными способами.

Количество и разнообразие мутаций даже в одном факторе Н очень велико, но чаще всего врач имеет дело не с одной мутацией, а с несколькими в одном белке или с несколькими в разных белках (например,

Н и МСР). При том что наследование может быть и аутосомно-доминантным, и аутосомно-рецессивным, пенетрантность составляет около 50% – это говорит о наличии каких-то «вспомогательных» механизмов при формировании аГУС. Поэтому молекулярно-генетическое исследование представляет определенные трудности и является многоэтапным [23].

Помимо генетического разнообразия, могут быть выявлены смешанные варианты, при которых «классический», или «истинный» ГУС сопровождается активацией системы комплемента и выступает как «спусковой крючок» для развития на этом фоне аГУС (в качестве «спускового крючка» может выступать и беременность).

Таким образом, аГУС – чрезвычайно многоликое заболевание и с молекулярной, и с диагностической, и с клинической точек зрения. Именно на нем был опробован первый и пока единственный зарегистрированный и одобренный FDA препарат, ингибирующий активность компонента С5 системы комплемента человека, – экулизумаб (Солирис), моноклональное рекомбинантное гуманизированное антитело против С5, которое, скорее всего, станет препаратом выбора при подобных состояниях. Смертность пациентов, не получающих плазму или экулизумаб и имеющих мутации в факторе Н, достигает 20%, а 50% выживших приобретают хроническую почечную недостаточность. В то же время экулизумаб блокирует внутрисосудистый гемолиз и уменьшает проявления тромботической микроангиопатии, то есть значительно снижает основные проявления аГУС. Недостатком препарата является довольно высокая его цена как в России, так и за рубежом, что, впрочем, характерно для многих препаратов для лечения орфанных заболеваний.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия.

Это еще одно заболевание, ярко иллюстрирующее последствия нарушения регуляции в системе комплемента. Проявляется спонтанным (как полагают ранее) внутрисосудистым гемолизом и появлением гемоглобина в моче [24]. Молекулярная причина этого заболевания состоит в своеобразном дефекте белков – регуляторов системы комплемента. На поверхности многих клеток человека, в том числе эритроцитов, находится белок CD55 (*decay-accelerating factor* – DAF), который блокирует С3b (альтернативный путь) и С4b (классический и лектиновый пути) на мембранах собственных клеток, не позволяя сформировать на их поверхности С3b-конвертазу.

Другой белок из группы мембраносвязанных регуляторов комплемента – CD59 (протектин), который, связываясь с С7 и С8, не дает сформировать на мембране «своей» клетки МАК [25]. Оба эти белка «заякорены» в мембране с помощью специальной

молекулярной конструкции – гликозилфосфатидилинозитола, который погружен в мембрану и играет роль «якоря». В процессе синтеза «якоря» принимает участие ряд ферментов, мутации в генах которых приводят либо к плохому «заякориванию», либо вообще к его отсутствию. Наиболее часто мутация встречается в гене *PIGA*, кодирующем белок фосфатидил-инозитол гликан А (X-хромосома). Эта мутация возникает в одной или нескольких гемопоэтических клетках и приводит к повреждению целого ряда мембранных белков, но типичная клиническая картина определяется именно неспособностью противостоять собственному комплементу [26].

Защиту в виде CD55 и CD59 имеют и эритроциты, и лейкоциты, и тромбоциты, но именно эритроциты как наиболее массовые клетки, не имеющие возможности «сбросить» с себя МАК или побороться с ним другими способами, формируют характерную клиническую картину. Помимо внутрисосудистого гемолиза, у 40% пациентов она включает тромбозы глубоких вен голени, а также необычных мест – порталных, мезентериальных сосудов, сосудов головного мозга и др., которые становятся причиной смерти. Однако причина самих тромбозов и ее связь с дефектом гена *PIGA* неясны.

Вопрос о том, почему в названии заболевания речь идет именно о ночной форме гемоглобинурии, до сих пор является дискуссионным, хотя гемоглобин в утренней порции мочи можно обнаружить лишь у 25% пациентов.

Надо отметить, что в крови пациентов постоянно присутствуют как «больные» клетки – результат работы соответствующего клона, так и «здоровые». При этом доля «больных» клеток может варьировать от 10 до 90%, но это не влияет на выраженность тромботических осложнений у этих пациентов. Гемолитический криз может быть спровоцирован различными внешними факторами – общими инфекциями, хирургическим вмешательством, вакцинацией, приемом препаратов (антибиотиков). В качестве первичной патологии или как осложнение может сформироваться недостаточность костного мозга (апластическая анемия или миелодиспластический синдром) [27–29].

До появления экулизумаба – блокатора C5 – смертность от тромботических осложнений в течение 5 лет составляла 35%, средняя продолжительность жизни пациентов – 10 лет от начала заболевания. Экулизумаб исходно был разработан именно для лечения ПНГ и впервые применен у пациента в июне 2007 года. Результаты превзошли ожидания: продолжительность и качество жизни таких больных соответствуют теперь средним по популяции [30].

Большой и очевидный минус при приеме экулизумаба – инфекционные осложнения (менингококковая инфекция), к тому же этот препарат считается самым

дорогим – годового курса стоит порядка 440 тыс. долларов США.

Возрастная макулодистрофия (ВМД, или AMD).

Макулодистрофия – патология сосудов и ишемия центральной зоны сетчатки, которая приводит к слепоте. В отличие от описанных выше ПНГ или аГУС – орфанных заболеваний, ВМД – одна из самых частых причин слепоты у лиц старше 55 лет (после катаракты и глаукомы), затрагивающая миллионы людей. В диапазоне 65–75 лет вероятность получить ВМД составляет 10%, а после 75 лет – уже 30%.

Безусловно, с возрастом зрение не улучшается по многим причинам. Среди факторов риска – такие общеизвестные, как курение, ожирение и жирная пища, артериальная гипертензия, атеросклероз, высокий уровень холестерина и др. Патогенез заболевания в начальной стадии заключается в накоплении депозитов желтоватого цвета – друзов – между пигментным эпителием и сосудистой оболочкой. Это ведет к местной дегенерации сетчатки и росту новообразованных сосудов из сосудистой оболочки, знаменующему переход от «сухой» формы ВМД к так называемой «влажной» (экссудативной). Эта стадия развивается значительно быстрее и имеет негативные перспективы, поэтому именно на этой стадии назначают лечение – лазерокоагуляцию и фотодинамическую терапию, цель которых – любым способом остановить рост сосудов в области желтого пятна. Краткое описание признаков этого заболевания выглядит как типично возрастное, дегенеративное, в этом случае мы не ждали от генетических исследований каких-то неожиданных результатов. Вероятность развития заболевания у лиц, имеющих больных родственников, примерно в 6 раз выше, чем в среднем по популяции [31].

Связанные генетические исследования позволили определить пять вариантов генов, локализованных на трех хромосомах (1; 6 и 10-й), которые коррелируют по крайней мере с 50%-м риском этого заболевания. Эти гены кодируют следующие белки [32]:

- фактор Н комплемента (1-я хромосома);
- HTRA-сериновую пептидазу (6-я хромосома);
- фактор В и фактор С2 комплемента (10-я хромосома).

Недавно обнаружено, что в процессе ВМД, возможно, задействован C1-ингибитор (ген *SERPING1*), шесть мутаций в котором связали с макулодистрофией [33]. В эту группу входит также центральный белок системы комплемента C3 [34]. Четыре из пяти белков оказались факторами комплемента, два из которых – важнейшие регуляторные белки.

Макулодистрофия – многофакторное заболевание, и этим списком полиморфизмов не исчерпываются варианты, ассоциируемые с этой патологией.

Но только белки комплемента оказались представленными в этом заболевании «системным» образом. Вопрос о патогенетической связи системы комплемента с формированием дегенеративных изменений на сетчатке неясен, учитывая многофакторность заболевания, и интенсивно обсуждается [35]. Однако это не останавливает попыток фармакологов опередить ситуацию, предлагая без преувеличения массовому потребителю препараты, влияющие на формирование «сухой» формы AMD, которая характеризуется появлением так называемой «географической атрофии» и рассматривается многими специалистами как первая фаза этого заболевания. Несмотря на полное отсутствие понимания того, какое место в патогенезе AMD занимает система комплемента, один лишь факт множественной корреляции генов ее регуляторных белков с высоким риском заболевания оказался достаточным основанием для проведения клинического исследования влияния препарата лампализумаба (*lampalizumab*) – моноклонального гуманизированного антитела (Fab), ингибитора фактора комплемента D – на течение AMD (исследование MAHALO, фаза II, 18 мес., введение препарата в стекловидное тело в течение 1 мес.) [36]. Результат – снижение выраженности «географической» атрофии от 20 до 44% случаев (сейчас препарат находится на III фазе исследования [37]).

Препараты, влияющие на систему комплемента. На данный момент разрешен и применяется для лечения ПНГ и аГУС только один препарат –

экулизумаб (США). Примерно 20 препаратов находятся сейчас на разных стадиях исследования, 90–95% из них – гуманизированные антитела к различным компонентам комплемента, а 5% – низкомолекулярные ингибиторы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система комплемента представляет собой сложный механизм защиты организма, разбалансировка которого может привести к непоправимым последствиям. Это отчетливо проявляется при заболеваниях, ассоциируемых с системой комплемента и связанных с регуляторными нарушениями [38]. Широкое применение лекарственных препаратов ингибиторного типа в этой системе – дело недалекого будущего [39]. Однако применение любых фармпрепаратов в такой сложно «зарегулированной» системе всегда несет риск, связанный с непониманием деталей механизма ее работы [40].

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. МКБ 10, Международная Классификация Болезней, коды заболеваний, расшифровка диагнозов <http://mkb-10v.ru/>
2. Дефекты в системе комплемента коды МКБ 11. <http://icd11.ru/defecty-v-system-komplementa/>
3. Smith-Jackson K., Yang Y., Denton H., Pappworth I.Y., Cooke K., Barlow P.N., et al. Hyperfunctional complement C3 promotes C5-dependent atypical hemolytic uremic syndrome in mice. *J Clin Invest* 2019 Mar 1; 129 (3): 1061–75.
4. Grumach A.S., Kirschfink M. Are complement deficiencies really rare? Overview on prevalence, clinical importance and modern diagnostic approach. *Mol Immunol* 2014 Oct; 61 (2): 110–7.
5. Lewis L.A., Ram S. Meningococcal disease and the complement system. *Virulence* 2014 Jan 1; 5 (1): 98–126.
6. Truedsson L. Classical pathway deficiencies - A short analytical review. *Mol Immunol* 2015 Nov; 68 (1): 14–9.
7. Pan L., Lu M.-P., Wang J.-H., Xu M., Yang S.-R. Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World J Pediatr* 2019 Feb 22.
8. Macedo A.C.L., Isaac L. Systemic Lupus Erythematosus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. *Front Immunol* 2016; 7: 55.
9. Panelius J., Meri S. Complement system in dermatological diseases – fire under the skin. *Front Med (Lausanne)* 2015; 2: 3.
10. Lintner K.E., Wu Y.L., Yang Y., Spencer C.H., Hauptmann G., Hebert L.A., et al. Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2016; 7: 36.
11. Liphaut B.L., Umetsu N., Jesus A.A., Bando S.Y., Silva C.A., Carneiro-Sampaio M. Molecular characterization of the complement C1q, C2 and C4 genes in Brazilian patients with juvenile systemic lupus erythematosus. *Clinics (Sao Paulo)* 2015 Mar; 70 (3): 220–7.
12. Degn S.E., Jensenius J.C., Thiel S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet* 2011 Jun 10; 88 (6): 689–705.
13. Slade C., Bosco J., Unglik G., Bleasel K., Nagel M., Winship I. Deficiency in complement factor B. *N Engl J Med* 2013 Oct 24; 369 (17): 1667–9.
14. Ohsawa I., Honda D., Nagamachi S., Hisada A., Shimamoto M., Inoshita H., et al. Clinical and laboratory char-

- acteristics that differentiate hereditary angioedema in 72 patients with angioedema. *Allergol Int* 2014 Dec; 63 (4): 595–602.
15. RESERVED IU-AR. Orphanet: Search a disease [Internet]. [cited 2019 Mar 16]. Available from: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN
 16. 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.
 17. Wong E.K.S., Kavanagh D. Diseases of complement dysregulation-an overview. *Semin Immunopathol* 2018; 40 (1): 49–64.
 18. Morgan B.P., Harris C.L. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2015 Dec; 14 (12): 857–77.
 19. Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C., Foroud T., McClintick J.N., McGee B.M., et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001 Oct 4; 413 (6855): 488–94.
 20. Dragon-Durey M.-A., Frémeaux-Bacchi V. Atypical haemolytic uraemic syndrome and mutations in complement regulator genes. *Springer Semin Immunopathol* 2005 Nov; 27 (3): 359–74.
 21. Funato M., Uemura O., Ushijima K., Ohnishi H., Orii K., Kato Z., et al. A complement factor B mutation in a large kindred with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Clin Immunol* 2014 Aug; 34 (6): 691–5.
 22. Dickenmann M., Schifferli J.A. Atypical hemolytic uremic syndrome: update on the complement system and what is new. *Nephron Clin Pract* 2010; 114 (4): 219–35.
 23. Noris M., Bresin E., Mele C., Remuzzi G. Genetic Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J., Mefford H.C., et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1367/>
 24. Luzzatto L. PNH from mutations of another PIG gene. *Blood* 2013 Aug 15; 122 (7): 1099–100.
 25. Yamashina M., Ueda E., Kinoshita T., Takami T., Ojima A., Ono H., et al. Inherited Complete Deficiency of 20-Kilodalton Homologous Restriction Factor (CD59) as a Cause of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *New England Journal of Medicine* 1990 Oct 25; 323 (17): 1184–9.
 26. Takeda J., Miyata T., Kawagoe K., Iida Y., Endo Y., Fujita T., et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993 May 21; 73 (4): 703–11.
 27. de Latour R.P., Mary J.Y., Salanoubat C., Terriou L., Etienne G., Mohty M., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008 Oct 15; 112 (8): 3099–106.
 28. Dulau-Florea A., Maric I., Calvo K.R., Braylan R.C. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) in bone marrow aspirates. *Seminars in Hematology* 2019 Jan 1; 56 (1): 65–8.
 29. Merrill S.A., Brodsky R.A. Complement-driven anemia: more than just paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2018 30; 2018 (1): 371–6.
 30. Wijnsma K.L., Ter Heine R., Moes D.J.A.R., Langemeijer S., Schols S.E.M., Volokhina E.B., et al. Pharmacology, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Eculizumab, and Possibilities for an Individualized Approach to Eculizumab. *Clin Pharmacokinet* 2019 Feb 13;
 31. Maller J., George S., Purcell S., Fagerness J., Altshuler D., Daly M.J., et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006 Sep; 38 (9): 1055–9.
 32. Edwards A.O., Ritter R., Abel K.J., Manning A., Panhuysen C., Farrer L.A. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005 Apr 15; 308 (5720): 421–4.
 33. Rohrer B., Frazer-Abel A., Leonard A., Ratnapriya R., Ward T., Pietraszkiewicz A., et al. Association of age-related macular degeneration with complement activation products, smoking, and single nucleotide polymorphisms in South Carolinians of European and African descent. *Mol Vis* 2019 Feb 8; 25: 79–92.
 34. Maller J.B., Fagerness J.A., Reynolds R.C., Neale B.M., Daly M.J., Seddon J.M. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2007 Oct; 39 (10): 1200–1.
 35. Landowski M., Kelly U., Klingeborn M., Groelle M., Ding J.-D., Grigsby D., et al. Human complement factor H Y402H polymorphism causes an age-related macular degeneration phenotype and lipoprotein dysregulation in mice. *PNAS* 2019 Feb 26; 116 (9): 3703–11.
 36. Rhoades W., Dickson D., Do D.V. Potential role of lampalizumab for treatment of geographic atrophy. *Clin Ophthalmol* 2015; 9: 1049–56.
 37. ClinicalTrials.gov. A study investigating the efficacy and safety of lampalizumab intravitreal injections in participants with geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration (SPECTRI). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02247531>. NLM identifier: NCT02247531. Accessed July 28, 2017.
 38. Frazer-Abel A., Sepiashvili L., Mbughuni M.M., Willrich M.A.V. Overview of Laboratory Testing and Clinical Presentations of Complement Deficiencies and Dysregulation. *Adv Clin Chem* 2016; 77: 1–75.
 39. Yuan X., Gavriilaki E., Thanassi J.A., Yang G., Baines A.C., Podos S.D., et al. Small-molecule factor D inhibitors selectively block the alternative pathway of complement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. *Haematologica* 2017; 102 (3): 466–75.
 40. Schrezenmeier H., Höchsmann B. Drugs that inhibit complement. *Transfus Apher Sci* 2012 Feb; 46 (1): 87–92.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157

Свертывание крови в XXI веке: новые знания, методы и перспективы для терапии

Н.А. Подоплелова^{1,2}, В.Б. Сулимов^{3,4}, А.С. Ташилова^{3,4}, И.С. Ильин^{3,4},
М.А. Пантелеев^{1,2,5,6}, И.В. Леденева⁷, Х.С. Шихалиев⁷

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

² ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ Научно-исследовательский вычислительный центр ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁴ ООО «Димонта», Москва

⁵ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁶ ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва

⁷ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Нарушения в системе свертывания крови – лидирующая причина смертности и инвалидности в современном мире. В связи с этим как никогда актуальным становится поиск новых препаратов, способных предотвращать патологическое тромбообразование, не влияя при этом на нормальный гемостаз. Исследования последних десятилетий произвели переворот в понимании принципов работы и регуляции свертывания крови. Кроме того, появились новые, более эффективные подходы к разработке лекарств, в том числе методы компьютерного моделирования, позволяющие значительно сократить затраты времени и ресурсов на поиск новых молекул-кандидатов. В данном обзоре рассмотрены система свертывания крови, природа тромбоза, показана важная роль факторов Ха и XIa и причины, по которым их все чаще выбирают в качестве мишеней для разработки новых антикоагулянтов, а также представлены наиболее интересные из уже существующих ингибиторов, факторов свертывания Ха и XIa.

Ключевые слова: свертывание крови, тромбоз, антикоагулянты, ингибиторы факторов свертывания крови, компьютерный дизайн ингибиторов, молекулярный докинг

Сулимов А.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 139–157.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157

Blood coagulation in the 21st century: existing knowledge, current strategies for treatment and perspective

N.A. Podoplelova^{1,2}, V.B. Sulimov^{3,4}, I.S. Ilin^{3,4}, A.S. Tashilova^{3,4}, M.A. Panteleev^{1,2,5,6},
I.V. Ledeneva⁷, Kh.S. Shikhaliev⁷

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 Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow

³ Research Computing Center, Moscow State University, Moscow

⁴ LLC Dimonta, Moscow

⁵ Lomonosov Moscow State University, Moscow

⁶ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

⁷ Voronezh State University, Voronezh

Disorders in the blood coagulation system are the leading cause of death and disability in the modern world. So the search for new drugs that can prevent pathological thrombosis, while not affecting normal hemostasis, becomes more relevant than ever. Recent studies has been a revolution in the understanding of the principles of work and the regulation of blood coagulation. In addition, new, more effective approaches to drug development have now appeared. For example computer simulation methods that can significantly reduce the time and resources spent on the search for new candidate molecules. In the review, the blood clotting system, the molecular mechanisms of thrombosis, the role of blood coagulation factors Xa and XIa, and the urgency of developing new inhibitors of these targets are shown, and the most interesting inhibitors of factors Xa and XIa are presented.

Key words: blood coagulation, thrombosis, anticoagulants, inhibitors of coagulation factors, computer design of inhibitors, molecular docking

Sulimov A.V., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2020; 19 (1): 139–157.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157

Система свертывания крови представляет собой сложно организованную сеть ферментативных реакций, которая активируется при повреждениях и управляет формированием фибринового сгустка – студенистой субстанции, запечатывающей место ранения. Непрерывно находясь на страже целостности нашей сосудистой системы, механизм свертывания крови часто «ошибается»: в современном мире нет такой области медицины, где тромботические и геморрагические осложнения

не играли бы важной роли, отвечая в совокупности за огромную долю смертности и инвалидности. В онкологии, гематологии, иммунологии такие ситуации распространены особенно широко.

В значительной степени проблемы в терапии нарушений свертывания связаны с большими трудностями его регуляции. Несмотря на то что в этой системе уже 30 лет не открывали новых молекул (открыты несколько новых реакций), за эти годы произошел переворот в представлениях о том, как

© 2020 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 29.04.2019

Принята к печати 19.08.2019

Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией клеточного гемостаза и тромбоза НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,

ул. Саморы Машела, 1

E-mail: mapanteleev@yandex.ru

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 29.04.2019

Accepted 19.08.2019

Correspondence:

Mikhail A. Panteleev, PhD, DSc, Head of the Laboratory of cellular hemostasis and thrombosis of 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: mapanteleev@yandex.ru

она работает и какие ферменты должны стать оптимальными мишенями для терапии. Сам по себе тромбин – главный фермент свертывания – оказался под сомнением: его ингибирование неизбежно угнетает гемостаз наряду с тромбозом. Даже фактор Ха (также находящийся на пересечении всех ключевых путей) оказался более интригующей мишенью. Совершенно неожиданно такие молекулы, как фактор XIa, оказались в фокусе внимания как потенциальные мишени, ингибирование которых способно подавить тромбоз с небольшим ущербом для гемостаза.

Одновременно в течение этих десятилетий появились новые методы разработки лекарств, наиболее мощный из которых – компьютерный докинг, позволяющий протестировать молекулы – кандидаты на роль ингибиторов путем их помещения в активный сайт фермента-мишени и провести расчет взаимодействий. Этот подход требует соблюдения ряда условий: знания трехмерной структуры белка с высоким разрешением и понимания того, какую точку на поверхности белка надо выбирать. Однако для небольших растворимых внеклеточных мишеней ферментативной природы (все эти условия выполняются в случае белков свертывания) этот подход – мощнейший инструмент быстрого скрининга потенциальных молекул-кандидатов,

В данном обзоре предпринята попытка соотнести линии развития новых представлений о механизмах свертывания, новых методов поиска лекарств и их сочетания, благодаря которому сейчас появляется все больше потенциально интересных молекул, способных в скором будущем изменить лицо антикоагулянтной терапии. Мы детально рассмотрим систему свертывания крови, природу тромбоза, важную роль факторов свертываемости крови Ха и XIa, актуальность разработки соответствующих ингибиторов; представим наиболее интересные ингибиторы факторов Ха и XIa, их структуру и основные характеристики, определяющие их активность при связывании с этими мишенями. Кратко рассмотрим методы молекулярного моделирования, прежде всего докинг, которые все шире применяют на начальной стадии разработки новых лекарств, в том числе новых ингибиторов факторов свертываемости, роль докинга на начальной стадии разработки новых ингибиторов для заданных белков-мишеней, а также детально обсудим структуру активных центров факторов Ха и XIa, где связываются соответствующие лиганды.

Свертывание крови

Традиционно свертывание крови рассматривают как каскад ферментативных реакций (*рисунок 1*), в котором фермент, полученный в результате предыдущей реакции, катализирует следующую [1]. Хотя

некоторые реакции [2, 3] и механизмы [4] до сих пор обсуждаются, все основные элементы этого каскада остаются неизменными на протяжении последних 30 лет. Выделяют два основных способа инициировать свертывание крови: внешний путь (путь тканевого фактора) и внутренний (контактный).

Внешний путь начинается с контакта плазмы крови с трансмембранным белком – тканевым фактором, который в норме отсутствует на клетках крови и эндотелии сосудов. Контакт плазмы с тканевым фактором возможен только при повреждении эндотелия сосуда, например, в результате механической травмы или воспаления. Сериновая протеаза фактор VIIa при связывании с тканевым фактором приобретает ферментативную активность и активирует факторы IX и X. При этом фактор IXa может напрямую активировать фактор X, а тот в свою очередь – протромбин в тромбин. Тромбин посредством частичного протеолиза превращает растворимый белок фибриноген в фибрин, который, полимеризуясь, приводит к желированию плазмы в месте повреждения.

Сами по себе факторы Ха и IXa крайне медленно расщепляют свои субстраты, для полноценной работы им нужно образовать комплексы со своими кофакторами – Va и VIIIa соответственно. При этом образование комплексов происходит на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах, которые в организме предоставляются, по-видимому, активированными тромбоцитами, микровезикулами и липопротеинами плазмы крови. Тромбин способен значительно ускорять собственное производство за счет активации кофакторов Va и VIIIa. Тромбин активирует также фактор XI, который затем обеспечивает дополнительный путь активации фактора IX.

Кроме того, существует альтернативный способ запустить свертывание крови – так называемый внутренний, или контактный, путь, в котором фактор XIIa активирует фактор XI. В данном случае свертывание начинается после автоактивации фактора XII, вызванной контактом с инородной отрицательно заряженной поверхностью, например, стенками пробирок, катетеров, а также мембранами бактерий при инфекциях. Интересно, что дефицит фактора XII не связан с кровоточивостью и, видимо, не играет значительной роли в нормальном гемостазе [6].

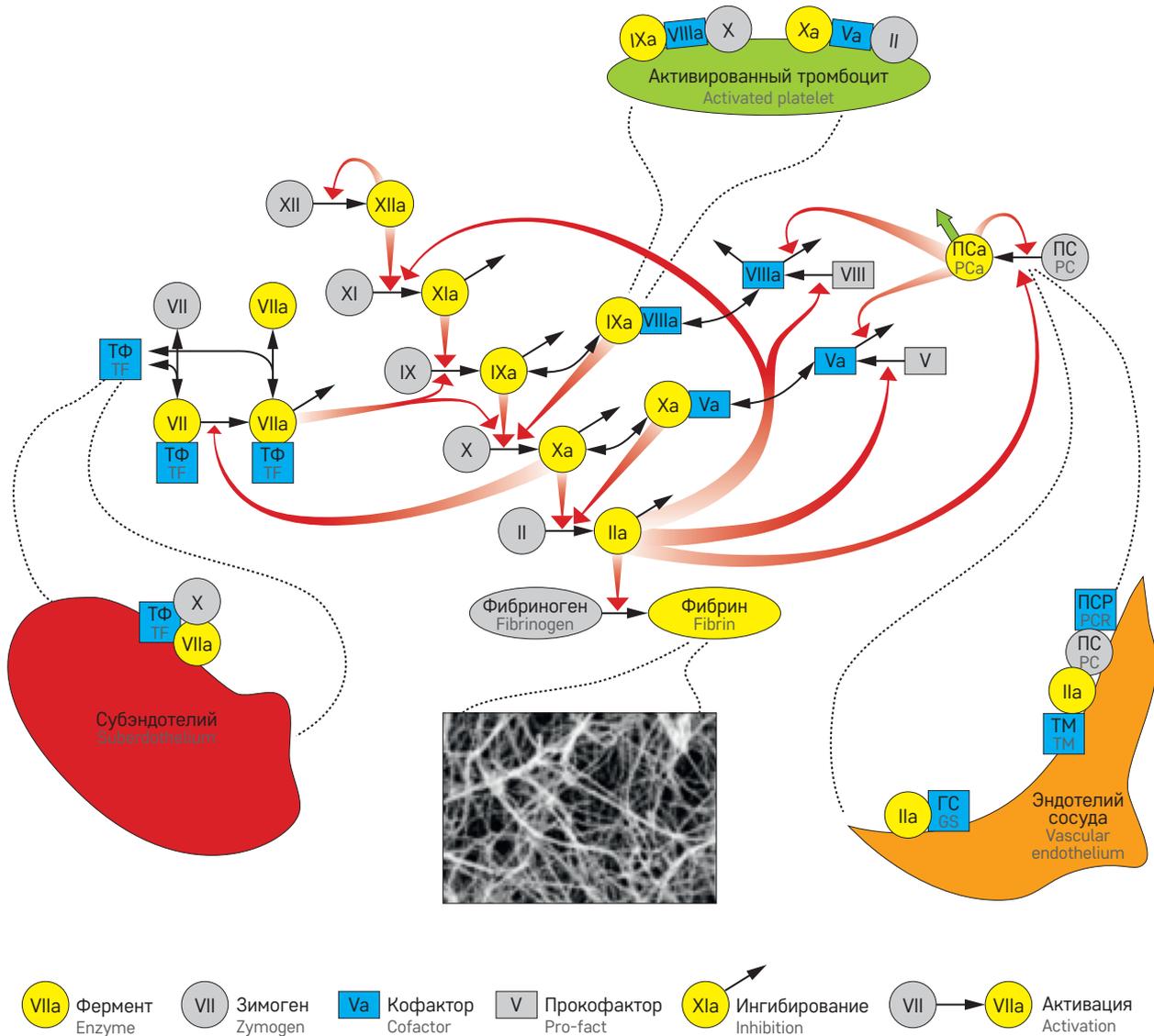
Для предотвращения неконтролируемой активации и свертывания в каскаде присутствует ряд ингибиторов – их больше десятка, при этом часть из них специфична к определенным факторам каскада, а другие могут подавлять активность практически любого фактора. Основными ингибиторами считаются антитромбин III и ингибитор пути тканевого фактора. Антитромбин III может ингибировать практически все основные протеазы свертывания,

Рисунок 1

Схема каскада свертывания [5] (адаптировано с модификациями)

Figure 1

The traditional cascade representation of blood coagulation biochemistry [5] (adapted with modifications)



Физиологическая активация свертывания обусловлена контактом крови с обнажившимся ТФ на субэндотелии. Связывание сериновой протеиназы фактора VIIa с ТФ ведет к переходу VIIa в активную конформацию, которая расщепляет и активирует факторы IX и X. Это запускает каскад свертывания, который завершается активацией фибриногена в фибрин под действием протеиназы тромбина (фактор IIa) и формированием фибринового геля. Каскад свертывания жестко регулируется многочисленными ингибиторами, положительными и отрицательными обратными связями. Все ключевые реакции каскада свертывания проходят на мембранах клеток крови и сосудистого русла: активация происходит на субэндотелии, сборка комплексов тенасы и протромбиназы – на активированных тромбоцитах, путь протеина С и инактивация тромбина антитромбином при участии гепарансульфата – на здоровом эндотелии. Второй путь активации каскада свертывания – контактный, через фактор свертывания XII. Этот путь играет ключевую роль в активации *in vitro*, но его физиологическая и патологическая роли не до конца ясны.

Coagulation is initiated by a contact of blood with a transmembrane protein tissue factor (TF). A low active serine protease factor VIIa binds TF to become a fully functional enzyme that activates factors IX and X. Then factor Xa activates prothrombin into thrombin. Thrombin (factor IIa) produces fibrin that spontaneously polymerizes resulting in gelation of plasma at the site of injury. The coagulation cascade is strongly regulated by different inhibitors, positive and negative feedbacks. The figure is shown that all the major reactions of the coagulation proceed on the membranes of blood cells and the vascular wall: subendothelium is triggered coagulation, activated platelets are source of membrane for assembly of the tenase and prothrombinase complexes, non injured endothelium is support of the protein C pathway and thrombin inactivation by heparan sulfate. Other way triggering coagulation is contact pathway through the activation of factor XII. This pathway plays a key role in the *in vitro* activation, but its physiological and pathological roles are not clear.

а ингибитор пути тканевого фактора специализируется на подавлении активности фактора VIIa. Существует система реакций пути протеина С, которая направлена на деградацию кофакторов Va и VIIIa. Активация пути протеина С запускается тромбином и в значительной степени регулируется несколькими кофакторами, среди которых протеин S, эндо-

телиальный рецептор протеина С и тромбомодулин. Протеин S – кофактор протеина С при инактивации кофакторов Va и VIIIa. Два других белка связывают протеин С и тромбин, увеличивая скорость активации протеина С на поверхности эндотелия.

Каскадное устройство системы свертывания кажется очень логичным и понятным, когда мы

говорим о гомогенной системе. Однако, как только мы переходим к рассмотрению реальных тромбов, картина сильно усложняется [5, 7]. Становится очевидна сильная пространственная неоднородность всех происходящих процессов. Так, активация пути тканевого фактора происходит на поврежденном эндотелии, после чего активированные факторы диффундируют в плазму и связываются с мембранами активированных тромбоцитов. При этом на мембранах протекают прокоагулянтные реакции – такие как активация фактора Xa и тромбина, а сама плазма из-за циркулирующих в ней ингибиторов оказывает антикоагулянтный эффект. Нарушение в балансе между про- и антикоагулянтными реакциями приводит к развитию патологических процессов и неконтролируемому тромбообразованию.

Эти соображения способствовали появлению новых экспериментальных подходов [8], которые в свою очередь сформировали новую картину свертывания крови (рисунок 2), а именно: часть реакций

свертывания отвечает за формирование порогового ответа на повреждения; другие, такие как активация фактора XIa тромбином, служат для распространения сгустка в пространстве, а третьи, как путь протеина C, управляют остановкой роста. Кроме того, долгоживущий фактор XIa способен распространяться потоком и вызывать нежелательное тромбообразование вдали от активатора. Это позволяет предположить, что такие факторы, как фактор XIa, могут быть интересными мишенями для терапии.

Тромбоз: артериальный, венозный, микрососудистый. Мишени для терапии

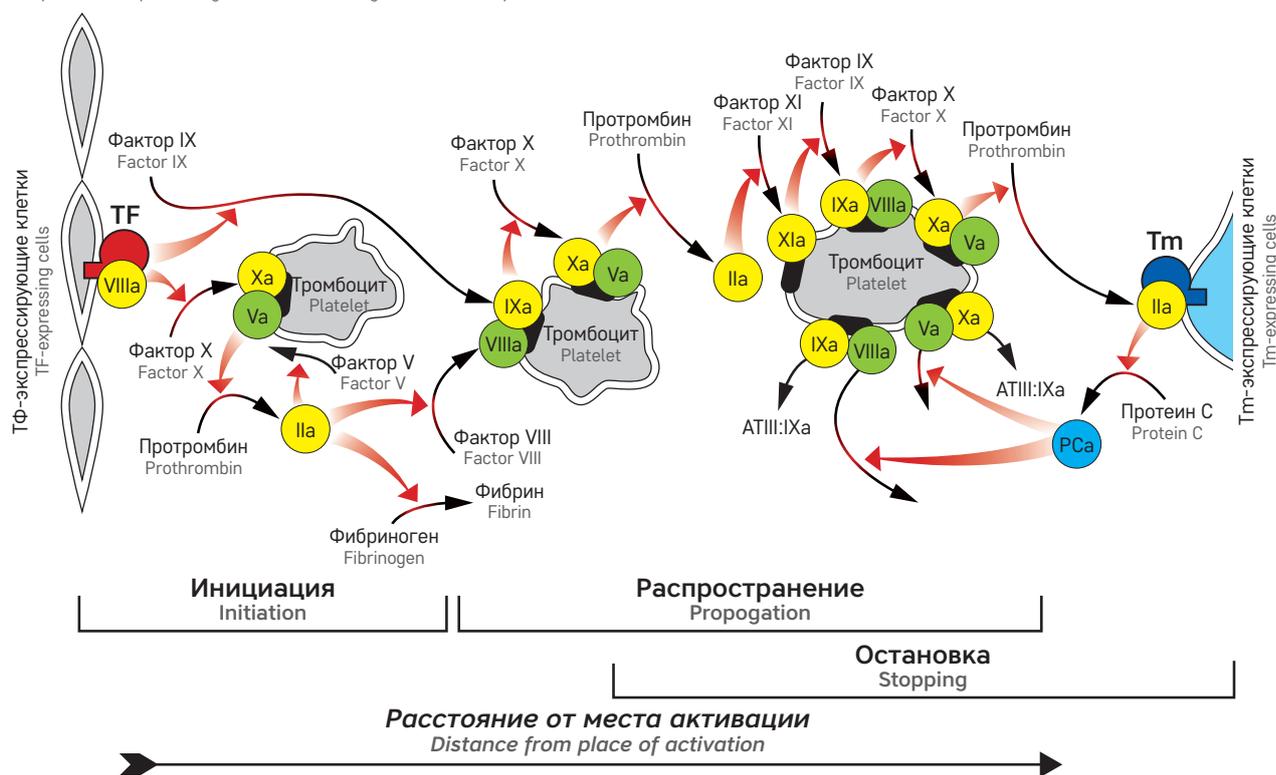
Что известно о роли этих факторов в реальном тромбообразовании? Нарушения в свертывающей системе организма человека остаются лидирующей причиной смертности и инвалидизации в современном мире. Тромбозы сопровождают широкий круг патологических и физиологических состояний человека, таких как атеросклероз, инсульт, инфаркт, бере-

Рисунок 2

Схема пространственной концепции регуляции каскада свертывания [7] (адаптировано с модификациями)

Figure 2

The spatial concept of coagulation cascade regulation [7] (adapted with modifications)



Свертывание активируется клетками, экспрессирующими тканевый фактор (слева) и распространяется вглубь сосуда. Начальная фаза свертывания определяется производством фактора Xa комплексом внешней теназы. Однако фактор Xa не может диффундировать далеко от активатора из-за быстрого ингибирования, поэтому в фазе распространения он образуется благодаря комплексу внутренней теназы. При этом фактор IXa, являющийся лимитирующим компонентом внутренней теназы, производится внешней теназой. В отличие от фактора Xa он слабо ингибируется и может диффундировать на значительные расстояния. При дальнейшем увеличении размеров сгустка дополнительный фактор IXa активируется под воздействием фактора XIa. Наконец, остановка роста тромба происходит под воздействием протеина C, который инактивирует кофакторы Va и VIIIa, останавливая тем самым образование тромбина.

Coagulation is triggered by cells expressing tissue factor (left) and extends into the vessel. The initial phase of coagulation is activation of factor Xa by a complex of the external tenase. However, factor Xa cannot diffuse far from the activator; therefore, most fraction of factor Xa is formed in the propagation phase with the complex of internal tenase involved. Moreover, factor IXa, which is the limiting component of internal tenase, is produced by external tenase. Unlike factor Xa, it is not inhibited and can diffuse over significant distances. With a further increase in clot size, additional factor IXa is activated by factor XIa. Finally, the thrombus growth is stopped by protein C, which inactivates the cofactors Va and VIIIa, thereby stopping the formation of thrombin.

менность, сепсис, посттравматические состояния, а также различные хирургические вмешательства. В клинике применяют различные антикоагуляционные препараты, но поиск новых – более эффективных и безопасных – продолжается [9].

В зависимости от локализации и задействованных механизмов принято выделять артериальный, венозный и микрососудистый тромбозы. Основные клинические проявления артериального тромбоза – это ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром, инфаркт миокарда и ишемический инсульт. Основной причиной возникновения артериальных тромбов обычно считают разрушение атеросклеротической бляшки, из-за которого на поверхности эндотелия появляются тканевый фактор и фактор фон Виллебранда. В артериях образуются так называемые «белые тромбы», богатые тромбоцитами [10]. Именно поэтому долгое время считалось, что из-за высоких скоростей сдвига основным механизмом образования тромбов в данном случае являются адгезия и агрегация тромбоцитов, а образование фибринового сгустка вторично и необходимо для стабилизации тромба [11, 12]. Важно отметить, что тромбоцитарное и плазменное звенья гемостаза тесно связаны между собой. Например, тромбин является одним из главных активаторов тромбоцитов [13], а фибриноген необходим для агрегации активированных тромбоцитов. И наоборот, активированные тромбоциты предоставляют отрицательно заряженную фосфолипидную поверхность, которая обеспечивает сборку прокоагулянтных комплексов [14–16].

Стандартное лечение пациентов с ишемической болезнью сердца и острым коронарным синдромом – это двойная антитромбоцитарная терапия аспирином и ингибитором рецептора P2Y₁₂ [17]. Однако даже при одновременной терапии двумя антиагрегантами от 2 до 5% пациентов имеют риск рецидива в течение следующего года [18, 19]. Альтернативная стратегия предотвращения тромбозомболических осложнений у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями заключается в добавлении антикоагулянта в стандартную антиагрегантную терапию. Ранние исследования показали снижение риска инфаркта миокарда и ишемического инсульта у пациентов с острым коронарным синдромом, принимающих аспирин и варфарин. Однако эти пациенты имели повышенный риск кровотечения по сравнению с пациентами, получавшими только аспирин [20]. В более поздних исследованиях было показано, что добавление ривароксабана к стандартной антитромбоцитарной терапии уменьшало смертность у пациентов с острым коронарным синдромом, но также за счет увеличения риска кровотечений [21]. В настоящее время ривароксабан одобрен для применения вместе с антитромбоцитарной терапией для паци-

ентов с острым коронарным синдромом в Европе, но не в Соединенных Штатах.

Венозный тромбоз во многом отличается от артериального по локализации и структуре тромбов, а также по механизмам их образования. В венах, в отличие от артерий, образуются так называемые «красные тромбы», состоящие в основном из полимеризованного фибрина с заключенными в нем эритроцитами. Основы патогенеза венозного тромбоза еще в позапрошлом веке разработал *Р. Вирхов*, описавший природу тромбоза в триаде: изменения в стенке сосудов, снижение скорости тока крови, повышение свертываемости крови [22]. Из этих трех факторов, безусловно, лучше всего изучены механизмы, вызывающие повышенную свертываемость крови, и их влияние на развитие венозного тромбоза.

Интересно, что чаще всего прикрепление венозного тромба к стенке сосуда происходит за счет фибрина [23], при этом стенка сосуда остается неповрежденной. По всей видимости, стимулом для тромбообразования является активация эндотелия под воздействием застоя крови или локального воспаления, а не его физическое повреждение. Активированный эндотелий секретирует фактор фон Виллебранда и р-селектин. Эти белки вызывают адгезию тромбоцитов, моноцитов, нейтрофилов и эритроцитов, а также микровезикул из этих клеток [24]. Под воздействием гипоксии моноциты экспонируют тканевый фактор, вызывающий активацию свертывания. Дополнительным источником тканевого фактора могут быть везикулы из моноцитов и эозинофилы [25, 26]. Кроме того, в мембране эозинофилов были обнаружены окисленные фосфолипиды, которые могут увеличивать генерацию тромбина [27]. Вероятно, определенный вклад в образование венозных тромбов вносят также нейтрофилы. Давно известно, что они могут быть включены в состав растущих тромбов, однако считалось, что их основная роль связана с лизисом сгустка [28, 29]. Последние исследования показали возможность активации контактного пути свертывания нейтрофильными внеклеточными ловушками.

В последние годы появились данные, указывающие на активную роль эритроцитов в развитии венозного тромбоза. Так, эритроциты могут усиливать активацию и агрегацию тромбоцитов [30] и образовывать агрегаты с тромбоцитами [31]. Кроме того, экспрессия фосфатидилсерина на поверхности эритроцитов обеспечивает прокоагулянтную поверхность для активации тромбина [32].

Исторически патогенез тромбоза изучали в основном на крупных сосудах, но в последнее время большое внимание уделяется окклюзии микроциркуляторного русла [33]. Факторы, вызывающие тромбоз микрососудов, аналогичны тем, которые отвечают

за венозный тромбоз: изменения в стенке сосудов, снижение скорости тока крови, повышение свертываемости крови [22]. Однако различия в строении и размерах микро- и макрососудов обуславливают большую чувствительность микрососудов к любым изменениям. Факторами, запускающим микрососудистый тромбоз, могут быть осложнения при широком круге заболеваний: повреждении эндотелия в результате тяжелого сепсиса, васкулите, аномальной васкуляризации в раковых тканях или лучевом поражении. Кроме того, тромбоз может развиваться как следствие нарушения кровотока из-за скопления тромбоцитов, эритроцитов или лейкоцитов. Омечают тесную связь между развитием воспаления и микрососудистым тромбозом. Есть данные о том, что провоспалительные цитокины (например, фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-1 и интерлейкин-6) могут вызывать активацию каскада свертывания крови [34].

Образование микротромбов, окклюзия микрососудов и остановка кровотока приводят к гипоксии и образованию активных форм кислорода, которые в свою очередь ведут к дальнейшему повреждению

эндотелия. Таким образом, создается замкнутый круг, приводящий к неблагоприятному исходу. В случае локализованного тромбоза наблюдается инфаркт пораженного органа. При более обширных повреждениях может развиваться синдром полиорганной недостаточности. При этом уровень смертности варьирует в зависимости от клинических условий, обычно превышая 50%.

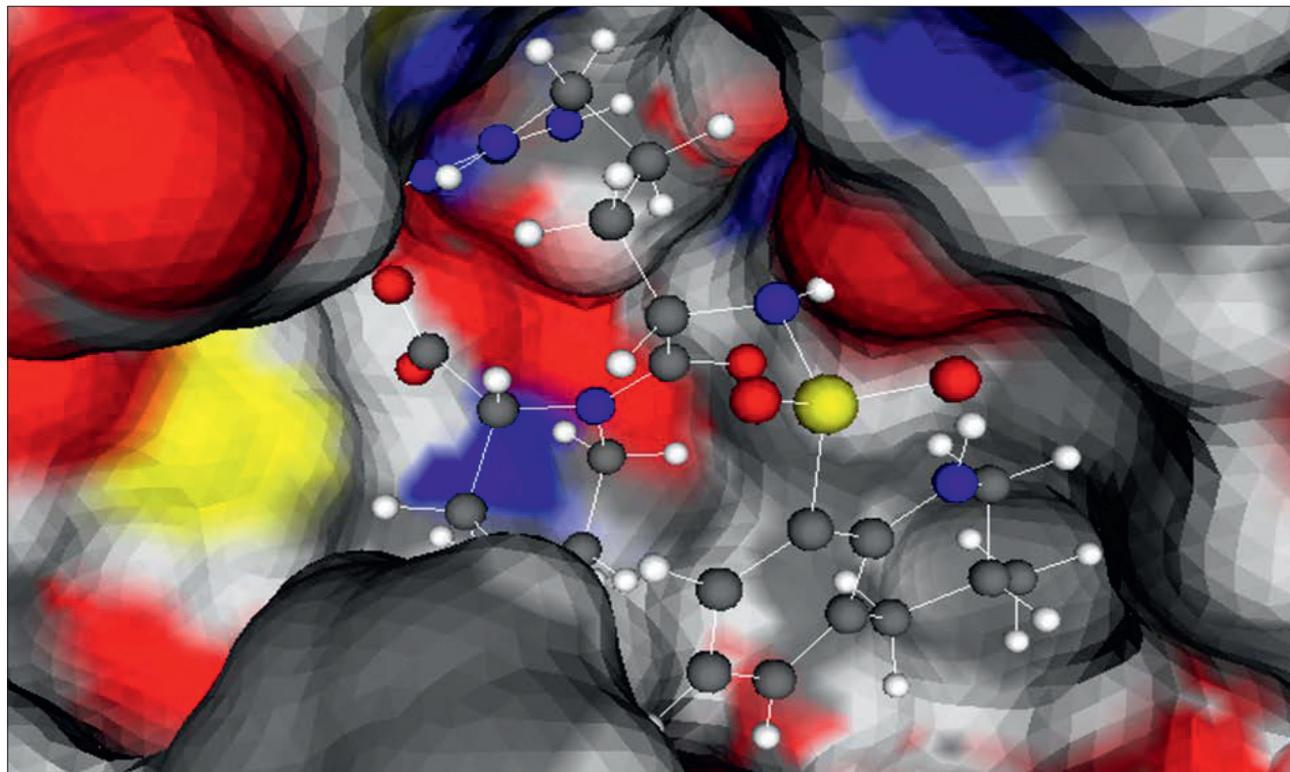
Понимание молекулярных механизмов тромбообразования способствует разработке иных подходов к созданию новых антитромботических препаратов. Существует несколько основных мишеней для разработки новых антикоагулянтов. Во-первых, можно блокировать начальную стадию свертывания, например, воздействуя на комплекс «тканевый фактор-фактор VII». Перспективными в этом плане выглядят ингибиторы контактного пути. Хорошо себя показали в экспериментах на животных инфестин-4 [35] и моноклональные антитела к факторам XII [36] и XI [37]. Кроме того, было показано, что применение олигонуклеотида, который специфично снижает экспрессию фактора XI, успешно снижает риск венозной тромбоэмболии у пациентов, пере-

Рисунок 3

Положение молекулы аргатробана в активном центре тромбина (найдено с помощью программы докинга SOL [49])

Figure 3

The position of the argatroban molecule in the active center of thrombin (the position was found by the SOL docking program [49])



Тромбин изображен в виде триангулированной поверхности, разделяющей белок и окружающий его растворитель – воду. Триангуляция нужна для решения уравнений, учитывающих взаимодействие белка с водой. Отдельные участки поверхности белка окрашены в разные цвета, соответствующие типам атомов белка, находящихся вблизи от этих участков: белый цвет соответствует атомам водорода, синий – азота, красный – кислорода, серый – углерода, желтый – серы.

Thrombin is shown as a triangulated surface which actually represents the solvent excluded surface. Construction of this surface is needed to solve equations that take into account the interaction of protein with water. Individual parts of the surface of the protein are shown in different colors corresponding to the types of protein atoms located close to these areas: white corresponds to hydrogen atoms, blue to nitrogen, red to oxygen, gray to carbon, yellow to sulfur.

несших артропластику колена [38]. Важно отметить, что уменьшение риска тромбоза в случае использования ингибиторов контактного пути не связано с повышенным риском кровотечения.

Другое важное направление разработки антикоагулянтов – блокирование стадий распространения свертывания и образования тромбина, которое можно осуществить, воздействуя на факторы IXa или Xa, или путем инактивации кофакторов Va или VIIIa. Кроме того, можно предотвратить образование фибрина, напрямую ингибируя тромбин. Прямые ингибиторы тромбина также блокируют опосредованную тромбином активацию факторов V, VIII и XI и ослабляют агрегацию тромбоцитов.

Несмотря на активные поиски, идеальный антикоагулянт, который бы селективно ингибировал патологическое тромбообразование с минимальным риском кровотечений, до сих пор не найден.

Докинг и другие методы компьютерного моделирования лекарств

Рассмотрим другую сторону проблемы: как создать ингибитор для новой интересной молекулы-мишени?

Рациональная разработка лекарств, как правило, основана на следующей парадигме: молекула лекарства должна избирательно связаться с определенным местом макромолекулы, участвующей в развитии заболевания, и воздействовать тем самым на течение болезни. Чаще всего такие макромолекулы-мишени – это белки, с их активными центрами должны связываться биологически активные молекулы. В дальнейшем для краткости мы будем называть такие биологически активные молекулы ингибиторам, хотя это могут быть и агонисты, антагонисты и модуляторы рецепторов белковой природы – главное, чтобы связывание этих молекул с белком-мишенью приводило к биологическому эффекту.

Компьютерное молекулярное моделирование начинает играть важную роль на начальной стадии разработки лекарств и опирается на информацию о структуре белков-мишеней, которая собирается в *Protein Data Bank* (PDB) [39]. Среди методов молекулярного моделирования, применяемых для разработки лекарств, центральную роль играет докинг [40, 41], с помощью которого осуществляется позиционирование лиганда (молекулы, которая может связаться с белком) в белке-мишени и дается оценка энергии связывания лиганда с белком, определяющая биологическую активность лиганда [42, 43]. Для примера на *рисунке 3* показано положение аргатробана – прямого ингибитора тромбина в активном центре последнего.

Существует несколько десятков программ докинга; обзоры по программам докинга и результатам соревнований по докингу появляются практически

ежегодно [44, 45]. Последние обзоры представлены в работах [46, 47], причем в обзоре [47] фокус сделан на описании характеристик программ, влияющих на точность докинга: применяемые силовые поля, методы вычисления энергии, модели учета растворителя, алгоритмы поиска наилучшей позы лиганда, глобальной и локальной оптимизации, учет гибкости лиганда и подвижности атомов в активном центре белка и упрощений, сделанных для ускорения докинга. Детально различные программы докинга рассмотрены в статье [48].

Прямые ингибиторы ключевых факторов свертывания

В этом разделе мы рассмотрим существующие и потенциальные молекулы, направленные на инактивацию многообещающих мишеней (в первую очередь, факторов Xa и XIa) в свертывании крови. Многие из них были выявлены благодаря компьютерному докингу, и даже после экспериментального подтверждения методы докинга позволяют глубже их исследовать и модифицировать.

Ингибиторы фактора Xa. Существует более десяти химических классов прямых ингибиторов фактора Xa; большинство из них детально описаны [50, 51]. Кроме того, пять соединений с избирательной активностью против фактора Xa используют в клинической практике для лечения патологий, связанных с повышенным тромбообразованием. Мы не рассматриваем все существующие ингибиторы фактора Xa, так как опубликованы посвященные им специализированные обзоры. В *таблице 1* приведены лишь некоторые наиболее интересные и детально изученные ингибиторы (по крайней мере начато их клиническое тестирование), дана подробная информация касательно их активности и стадии разработки, на которой находится конкретное соединение. Учитывая, что для соединений, представленных в *таблице 1*, как минимум были начаты клинические испытания, очевидно, что их фармакодинамические и фармакокинетические свойства, выявленные на этапе доклинических испытаний, приемлемы для тестирования на людях.

Современные тенденции в области разработки препаратов, связанных с фактором свертывания Xa, характеризуются двумя направлениями. С одной стороны, растет число случаев идентификации новых классов прямых ингибиторов фактора Xa, причем чаще всего с использованием методов молекулярного моделирования [52–56]. Примеры некоторых новых ингибиторов, разработанных с помощью компьютерного моделирования, приведены в *таблице 2*.

Второе направление, связанное с фактором Xa, – разработка средств, используемых для преры-

Таблица 1

Селективные ингибиторы фактора Ха, вошедшие в стадию клинических испытаний (КИ)
(информация о соединениях, не прошедших КИ, из [3])

Table 1

Selective inhibitors of factor Xa, which start the stage of clinical trials (CT)
(information on compounds that did not undergo CT was taken from [3])

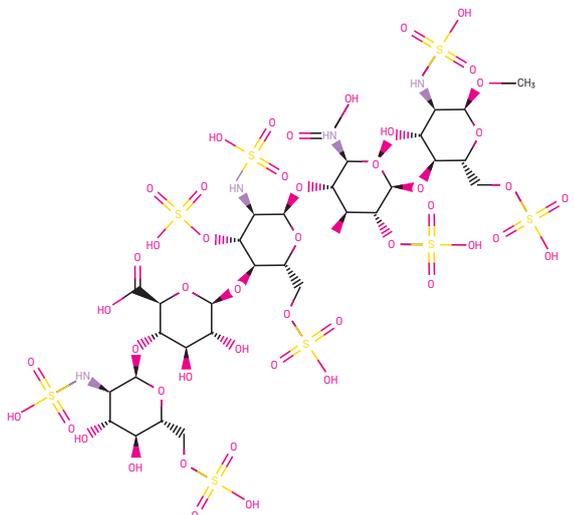
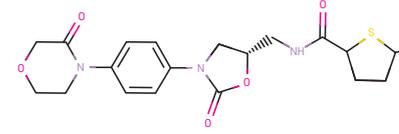
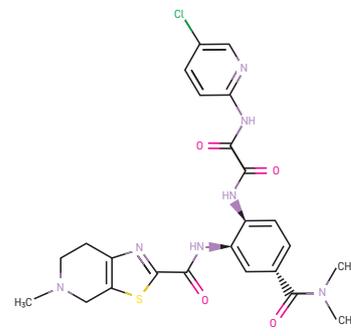
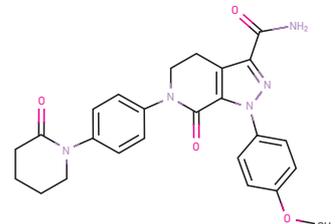
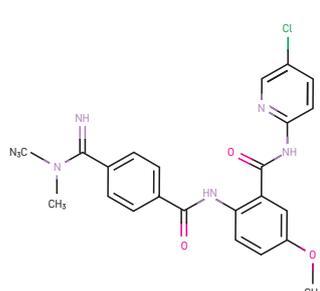
№	Название Name	Структура молекулы ингибитора Molecule structure	Активность в отношении фактора Ха Activity against factor Xa	Стадия разработки Development stage	Способ введения для лекарств Route of administration for drugs
1	Фондапаринукс Fondaparinux		Активность опосредована активацией антитромбина III Activity mediated by activation of antithrombin III	Одобен FDA FDA approved	Парентерально Parenteral
2	Ривароксабан Rivaroxaban		$K_i = 0,4 \text{ nM}$ $IC_{50} = 0,21 \text{ nM}$	Одобен FDA FDA approved	Перорально Oral
3	Эдоксабан Edoxaban		$K_i = 0,56 \text{ nM}$	Одобен FDA FDA approved	Перорально Oral
4	Апиксабан Arixaban		$K_i = 0,8 \text{ nM}$	Одобен FDA FDA approved	Перорально Oral
5	Бетриксабан Betrixaban		$K_i = 0,18 \text{ nM}$ $IC_{50} = 1,5 \text{ nM}$	Одобен FDA FDA approved	Перорально Oral

Таблица 1 (продолжение)

Table 1 (continuation)

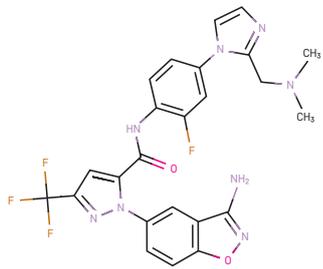
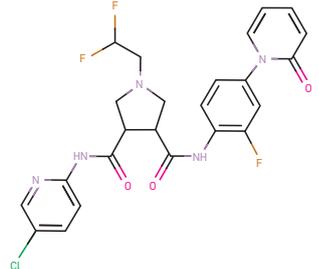
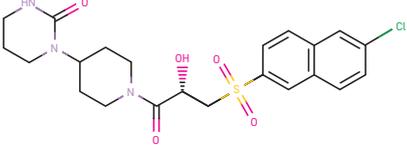
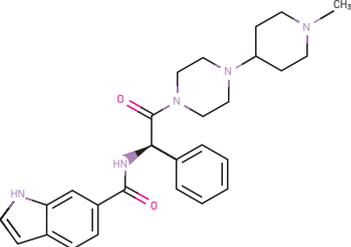
№	Название Name	Структура молекулы ингибитора Molecule structure	Активность в отношении фактора Xa Activity against factor Xa	Стадия разработки Development stage	Способ введения для лекарств Route of administration for drugs
6	Разаксабан Razaxaban		$K_i = 0,19 \text{ nM}$	Разработка прекращена на 2-й фазе КИ из-за плохого соотношения риск/польза Development stopped in Phase 2 CT due to poor risk / benefit ratio	—
7	Дарексабан Darexaban		$IC_{50} = 56,6 \text{ nM}$	Разработка прекращена на 3-й фазе КИ в связи выявленными побочными эффектами Development was stopped at the 3rd phase of CT due to identified side effects	—
8	R1663			Пройдена 1-я фаза КИ в 2012 г. С тех пор новых подробностей о разработке не было Passed the 1st phase of CT in 2012. Since then, there have been no new development details	—
9	Летаксабан Letaxaban		$K_i = 7 \text{ nM}$ $IC_{50} = 28,6 \text{ nM}$	Разработка прекращена после прохождения 2-й фазы КИ Development was stopped after the phase 2 CT	—
10	Эрибаксабан Eribaxaban		$IC_{50} = 0,32 \text{ nM}$	Разработка прекращена после прохождения 2-й фазы КИ Development was stopped after the phase 2 CT	—
11	LY517717		$K_i = 4,6 \text{ nM}$	Разработка прекращена на 2-й фазе КИ Development was stopped on the phase 2 CT	—

Таблица 2

Примеры ингибиторов фактора Xa, разработанных на основе компьютерного дизайна
(структуры молекул и их активность в отношении фактора Xa из [5–9])

Table 2

Factor Xa inhibitors developed by computer design

(the structures of molecules and their activity against factor Xa were taken from [5–9])

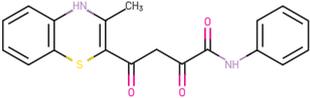
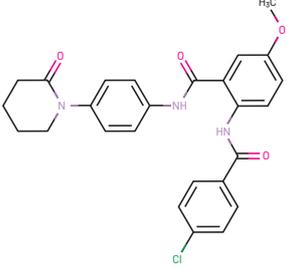
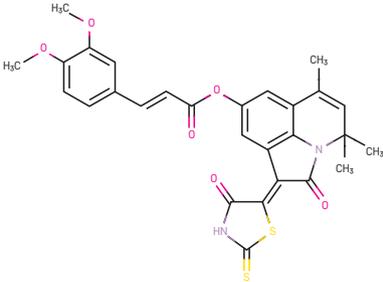
№	Название Name	Структура Molecule structure	Ингибирующая активность Activity against factor Xa	Селективность Selectivity	Подход к разработке Approach to design
1	NSC635393		$IC_{50} = 2,02 \text{ nM}$	Не исследовалась Not investigated	Виртуальный скрининг на основе формы лиганда, электростатической похожести и докинга Virtual screening based on ligand shape, electrostatic affinity and docking
2	9b		$IC_{50} = 23 \text{ nM}$	Не влияет на активность тромбина It does not affect thrombin activity	Дизайн виртуальной библиотеки на основе фрагментов. Консенсус докинг для оценки связывания Library design for fragment based screening. Consensus docking evaluation for binding prediction
3	17f		$IC_{50} = 700 \text{ nM}$	Не исследовалась Not investigated	Виртуальный скрининг на основе докинга Virtual screening based on docking
4	VGY 0224989		$IC_{50} = 3000 \text{ nM}$	Не ингибирует тромбин, трипсин, фактор IXa и фактор XIa It does not inhibit thrombin, trypsin, factor IXa and factor XIa	Виртуальный скрининг на основе докинга. Квантовохимический постпроцессинг Virtual screening based on docking. Postprocessing of docking results with semiempirical method

Таблица 3

Обратимые ингибиторы FXIa

Table 3

Reversible factor XIa inhibitors

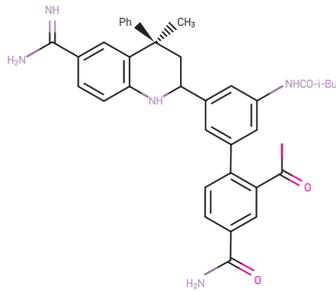
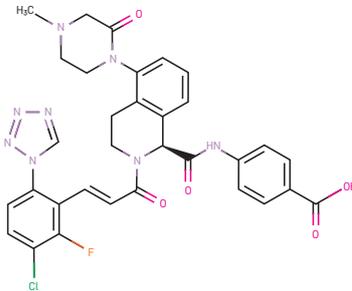
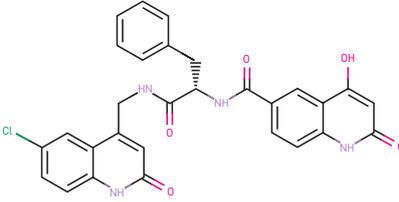
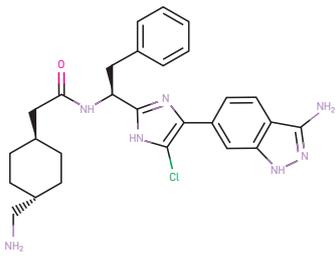
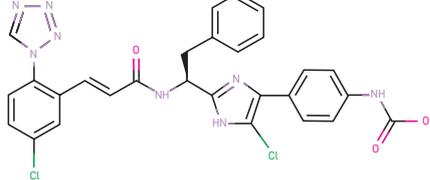
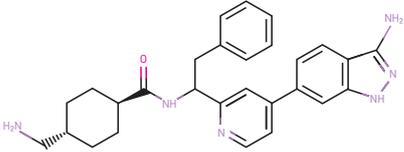
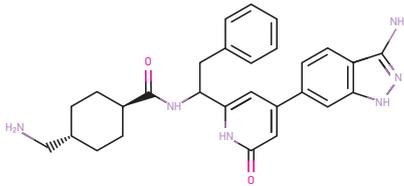
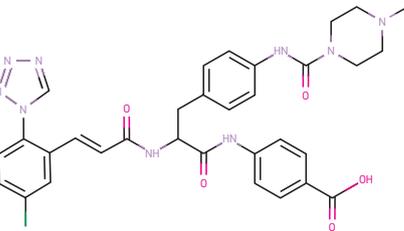
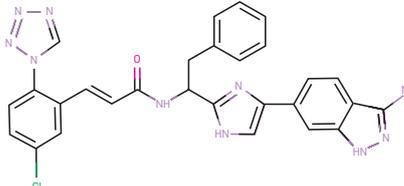
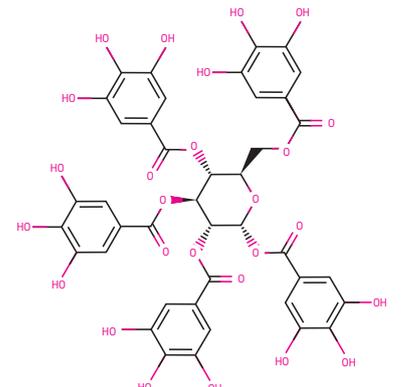
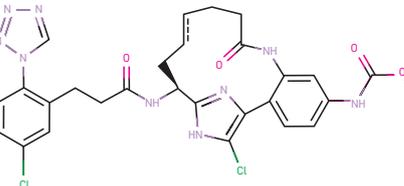
№	Название Name	Структура Molecule structure	Ингибирующая активность Activity against factor XIa	Ссылка Reference
1	BMS-654457		$K_i = 0,2 \text{ nM}$	[58]
2	BMS-962212		$K_i = 0,7 \text{ nM}$	[59]
3	Compound 3		$IC_{50} = 1,0 \text{ nM}$ $K_i = 0,5 \text{ nM}$	[61]
4a	Compound 4a		$K_i = 0,31 \text{ nM}$	[63]
4b	Compound 4b		$K_i = 6,7 \text{ nM}$	[63]
5	Compound 5		$K_i = 2,7 \text{ nM}$	[57, 66]

Таблица 3 (продолжение)

Table 3 (continuation)

№	Название Name	Структура Molecule structure	Ингибирующая активность Activity against factor XIa	Ссылка Reference
6a	Compound 6a		$K_i = 8,4 \text{ nM}$	[60]
6b	Compound 6b		$K_i = 3,7 \text{ nM}$	[60]
7	Compound 7		$K_i = 6,7 \text{ nM}$	[62]
8	Compound 8		$K_i = 2,0 \text{ nM}$	[64]
9	Compound 9		$K_i = 521 \text{ nM}$	[65]
10	Compound 10		$IC_{50} = 1300 \text{ nM}$	[57]

вания антикоагулянтного действия ингибиторов фактора Ха в случае неконтролируемых кровотечений, которые могут возникать при терапии препаратами данного класса. Так, *Andexanet Alfa* – рекомбинантный вариант фактора Ха, который не обладает ферментативной активностью, – получил одобрение FDA для контроля таких жизнеугрожающих состояний [57]. Другой пример такого средства – синтетическое неорганическое соединение *ciraparantag*, способное формировать множественные нековалентные связи с молекулами антикоагулянтов. Разработка подобных агентов свидетельствует о том, что на сегодняшний день не существует идеального антикоагулянтного средства, и поиск новых более безопасных средств для лечения тромботических состояний, в том числе не связанных с ингибированием фактора Ха, остается актуальной задачей.

Ингибиторы фактора XIa. Предполагается, что ингибиторы активированного фактора XI (FXIa) будут сочетать антикоагулянтный и профибринолитический эффекты с низким риском кровотечения. Низкомолекулярные ингибиторы FXIa еще не прошли всех необходимых доклинических и клинических испытаний и не получили разрешение на использование при лечении людей, однако разработки ингибиторов FXIa ведутся.

В работах [58] и [59] описано соединение BMS-654457 (таблица 3, № 1). Кинетические исследования, проведенные *in vitro* с хромогенным субстратом, показали, что это соединение является прямым обратимым и конкурентным ингибитором FXIa с $K_i = 0,2$ нМ и более чем с 1000-кратной селективностью по отношению к связыванию с FXa, FVIIa, FIXa, тромбином, трипсином, урокиназой и плазмином, однако оно не селективно к активированному протеину С и плазменному калликреину. Его активность оценена *in vivo* на кроличьих моделях электролитически индуцированного тромбоза сонных артерий и времени кровотечения кутикулы. BMS-654457 – обратимый и прямой ингибитор, перспективный для антитромботической терапии с широким терапевтическим окном.

В статье [60] описан прямой обратимый и селективный ингибитор FXIa BMS-962212 (таблица 3, № 2), находящийся на первой фазе клинических испытаний и имеющий в экспериментах *in vitro* $K_i = 0,7$ нМ.

Компания *Bristol-Myers Squibb* во второй половине 2018 года анонсировала вторую фазу клинических испытаний с пероральным ингибитором FXIa, BMS-986177. Первая фаза исследования безопасности и переносимости с BMS-986177 завершена, но структура и результаты исследования на данный момент не опубликованы.

В работе *Ola Fjellström* и соавт. [61] с помощью виртуального скрининга, основанного на методах докинга, было найдено очень сильное, селективное относительно FXa, FIXa и FIIa и трипсина соединение (таблица 3, № 3), которое в эксперименте *in vitro* в системе «белок–субстрат–ингибитор» показало активность: $IC_{50} = 1,0$ нМ; $K_i = 0,5$ нМ.

Согласно исследованиям [62] для улучшения биодоступности перорального и селективного относительно FXa, FVIIa, FIXa, FIIa и трипсина ингибитора (таблица 3, № 4 а) с $K_i = 0,31$ нМ (*in vitro* «белок–субстрат–ингибитор»; $t = 25$ °C) с помощью поиска структурных аналогов соединения и замены радикалов был найден новый ингибитор (таблица 3, № 4 б) с $K_i = 6,7$ нМ (*in vitro* «белок–субстрат–ингибитор»; $t = 25$ °C). По результатам исследований, это соединение оказывало умеренное пероральное воздействие на собак ($F\% = 10\%$).

В других исследованиях [58, 63] найдено соединение (таблица 3, № 5), обладающее хорошей ингибирующей активностью *in vitro* «белок–субстрат» ($K_i = 2,7$ нМ) и хорошей антикоагулянтной активностью *in vitro* ($EC_{1,5x} = 5,3$ μМ) в анализе с активированным частичным тромбопластиновым временем, однако оно не показало активности при пероральном приеме у собак. Дальнейший поиск с помощью преобразования химической структуры этого соединения не выявил перорально биодоступных соединений с более высокой активностью.

J.R. Corte, T. Fang и соавт. [64] представили сильнодействующие селективные соединения на основе пиридина и пиридинона с $K_i = 8,4$ нМ и $K_i = 3,7$ нМ соответственно (таблица 3, № 6 а, б). Соединение на основе пиридина обладает более чем 1000-кратной селективностью относительно основных сериновых протеаз, за исключением калликреина и трипсина. При дальнейшем исследовании [65] с помощью замены основного циклогексилметиламина Р1 нейтральным п-хлорфенилтетразолом Р1 открыто соединение № 7 ($K_i = 6,7$ нМ) (см. таблицу 3); его биодоступность при пероральном приеме значительно улучшилась по сравнению с сообщенной ранее (№ 6 а).

Исследование [66] привело к открытию соединения (таблица 3, № 8) с высокой аффинностью к FXIa и хорошей селективностью в отношении сериновых протеаз. Результаты активности на модели тромбоза у кроликов: *in vitro* – $K_i = 2,0$ нМ; *in vivo* – $EC_{50} = 2,8$ μМ.

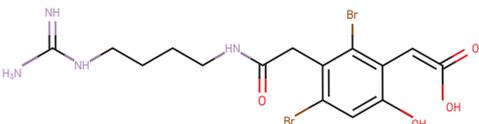
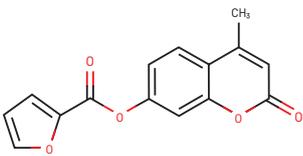
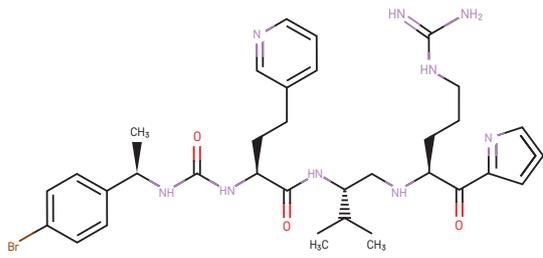
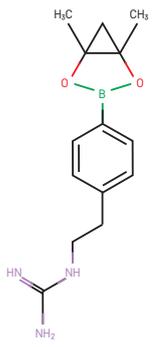
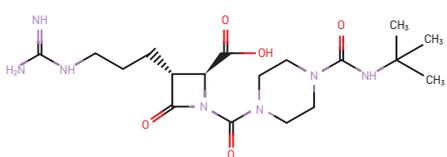
Согласно патентным базам на данный момент в качестве предполагаемых ингибиторов фактора свертывания FXIa, помимо синтетических соединений, рассматриваются и другие группы, в том числе соединения, выделенные из натуральных продуктов [67, 68],

Таблица 4

Ковалентные ингибиторы FXIa

Table 4

Covalent FXIa inhibitors

№	Название Name	Структура Molecule structure	Ингибирующая активность Activity against factor XIa	Ссылка Reference
1	Clavatadin A		IC ₅₀ = 1300 nM	[57]
2	Coumarin derivative		IC ₅₀ = 770 nM	[57]
3	3-pyridylmethyl-2-ketotriazole		IC ₅₀ = 12 nM	[65]
4	Compound 4		IC ₅₀ = 7300 nM	[65]
5	BMS-262084		IC ₅₀ = 2,8 nM	[65, 84]

макроциклические соединения [69, 70], хинолоновые и акридиновые соединения [71], имидазолильные производные [72], дипептидные аналоги [73].

В обзорах [51, 74–76] представлены основные группы веществ, предлагавшихся в качестве ингибиторов фактора XIa: моноклональные антитела; антисмысловые олигонуклеотиды (АСО); полипептиды; синтетические низкомолекулярные соединения (ациклические, моноциклические, бициклические, макроциклические), связывающиеся непосредственно с активным центром фактора XIa; синтетические аллостерические ингибиторы; естественные соединения, выделенные из природных источников.

Al-Horani и *соавт.* [77, 78] опубликовали серию сульфатированных пентагаллоилглюкопиранозидов в качестве аллостерических ингибиторов FXIa. Аллостерические ингибиторы не связываются с активным сайтом FXIa, похожим по своим свойствам на другие сериновые протеазы. Они селективны за счет нацеливания на уникальные свойства FXIa в других сайтах. Например, сульфатированный пентагаллоилглюкопиранозид (таблица 3, № 9) (β -SPGG-1) имеет $K_i = 521$ нМ с 200-кратной селективностью по сравнению с другими соответствующими ферментами.

Макроциклы были признаны важным структурным классом в открытии лекарственных препаратов: показано, что они улучшают аффинность связывания, селективность, метаболическую стабильность и фармакокинетические свойства по сравнению с соответствующими ациклическими предшественниками. Первые раскрытые макроциклические ингибиторы FXIa были описаны *S. Hanessian* и *соавт.* [80]. Согласно [74] ненасыщенный амидный линкер, который включал Е-алкен в 13-членный макроцикл, обеспечивал наномолярную активность к FXIa, который был дополнительно усилен хлоримидазолом (таблица 3, № 10) ($K_i = 0,03$ нМ).

Опубликованы данные (без структур) для нескольких дополнительных ингибиторов FXIa. Так, *M. Sakai* и *соавт.* [81] опубликовали данные для ONO-8610539 – селективного активного ингибитора FXIa ($K_i = 0,9$ нМ). Сообщается, что ONO-8610539 ингибирует образование тромба у кроликов и обезьян, не влияя на объем кровопотери в дозе, на 33% превышающей максимальный антитромботический эффект. DSR-130787, описанный *M. Mori* и *соавт.* [82], – перорально активное пролекарство ингибитора FXIa с $IC_{50} < 10$ нМ. Активная форма DSR-130787 при внутривенном введении кроликам демонстрирует антитромботический эффект, сравнимый с эффектом ингибитора тромбина, дабигатрана или ингибитора FXa, ривароксабана, но с гораздо более низким риском кровотечения.

Несмотря на то что наиболее перспективны для разработки низкомолекулярные ингибиторы FXIa, существуют классы высокомолекулярных ингибиторов [74]: ингибиторы, выделенные из натуральных продуктов; ДНК и РНК-аптамеры – короткие, одноцепочечные олигонуклеотиды (6–30 кДа), которые связывают специфические белковые мишени с высокой селективностью. РНК-аптамеры, нацеленные на FXIa, были идентифицированы с использованием систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX), антитела и АСО.

На стадии клинических испытаний находится ингибитор *IONIS-FXI_{RX}* (ISIS 416858), представляющий собой синтетический олигомер из 20 нуклеотидов, комплементарных последовательности мРНК FXI человека [74]. Ингибитор уменьшает синтез FXI и имеет отсроченный на несколько дней фармакологический эффект, так как период полураспада FXI составляет 50–70 часов. На первой фазе клинических исследований этот ингибитор исследовали на здоровых добровольцах, кровотечений, связанных с лечением, не наблюдалось. На данный момент *IONIS-FXI_{RX}* находится на второй фазе клинических исследований. Первое клиническое исследование второй фазы было проведено среди пациентов, перенесших плановую артропластику коленного сустава: показано, что при снижении циркулирующего в крови FXI снижается риск возникновения венозной тромбоэмболии.

Второе клиническое исследование второй фазы проведено среди пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности. Как и в исследовании случаев артропластики коленного сустава, *IONIS-FXI_{RX}* хорошо переносился и уменьшал уровни FXI в крови в зависимости от дозы. Запланировано еще одно клиническое исследование второй фазы у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, находящихся на гемодиализе [83].

Компания *Bayer* представила ингибитор BAY 1213790 – полностью человеческое моноклональное тело IgG1, которое блокирует каталитический домен FXIa человека с $IC_{50} = 2$ нМ [84]. В первой фазе клинического исследования антитело оказалось безопасным и хорошо переносимым, без серьезных побочных эффектов, связанных с приемом лекарства. Вторая фаза клинического исследования по профилактике венозной тромбоэмболии у пациентов, перенесших плановую первичную тотальную артропластику коленного сустава, была запланирована в июле 2017 года.

Xlsomab 3G3 от *Aronora Inc.* [85] представляет собой антитело, впервые полученное путем иммунизации мышей с дефицитом FXI рекомбинантным мышинным FXI. *Xlsomab 3G3* находится на первой фазе клинических исследований.

Наконец, в работах [58, 74] представлен обзор по ковалентным ингибиторам FXIa: например, клаватадин А (таблица 4; № 1) – натуральный продукт, выделенный из морской губки [67], является селективным ковалентным ингибитором ($IC_{50} = 1,3$ мкМ).

При связывании клаватадина А со структурой FXIa гуанидиновая единица P1 взаимодействует с Asp189 в кармане S1. Производное кумарина (таблица 4, № 2) ($IC_{50} = 0,77$ мкМ), как недавно сообщили A.J. Obaidullah и R.A. Al-Horani [68], образует ковалентную связь с Ser195. Кетотиазолсодержащее соединение (таблица 2, № 3) ингибирует FXIa с $IC_{50} = 12$ нМ [30] и обладает более чем 100-кратной селективностью к тромбину и 1000-кратной – к FXa. В статье [86] представлены функционализованные боронаты (таблица 4, № 4) в качестве ковалентных ингибиторов FXIa с низкой микромолярной активностью ($IC_{50} = 7,3$ мкМ). Эти ингибиторы напоминают ранние ингибиторы тромбина, которые образуют ковалентную связь между боронной кислотой и Ser195. В работе [74, 79] показано, что BMS-262084 (таблица 4, № 5) представляет собой β -лактаминный ковалентный ингибитор FXIa с $IC_{50} = 2,8$ нМ при экспериментальном исследовании *in vitro* «белок–субстрат–ингибитор». Этот ингибитор экспериментально проверен и на других человеческих сериновых протеазах, участвующих в коагуляции (FXIIa, плазменный калликреин, FVIIa, FIXa, FXa, тромбин) и фибринолизе (ткани активатора плазминогена, урокиназа, плазмин); в результате оказалось, что соединение (№ 1) ингибирует эти белки в 70 раз слабее.

Итак, оставляя в стороне ковалентные ингибиторы, необходимость и безопасность использования которых еще не до конца ясны, можно сказать, что на данный момент представленные низкомолекулярные соединения находятся на стадии улучшения пероральной биодоступности или доклинических испытаний на животных, за исключением ингибитора FXIa – BMS-962212, который прошел первую фазу клинических исследований. BMS-962212 – это активное соединение, растворимое в воде и пригодное для парентерального введения. Первую фазу клиниче-

ских испытаний прошло также BMS-986177, однако структура этого соединения и результаты данного исследования в доступных публикациях не представлены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы являемся свидетелями замечательного процесса, когда сочетание представлений о регуляции и физиологии свертывания крови, молекулярных знаний и инновационных подходов фармакологии привело к взрывному появлению новых молекул, в перспективе способных изменить подходы к антикоагулянтной профилактике и терапии. По-видимому, наиболее «горячая» мишень в системе свертывания крови для разработки новых антикоагулянтов – фактор XIa. Несмотря на то что затрачены значительные усилия и открыто сравнительно большое количество ингибиторов этого фактора, ни одно соединение пока не получило разрешения на применение в медицинской практике, а значит, нужны дальнейшие исследования по поиску новых ингибиторов фактора свертываемости крови XIa, в том числе с помощью докинга и других методов молекулярного моделирования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-10097)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Podoplelova N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8013-1112>

Sulimov V.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7102-6107>

Tashilova A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8701-5472>

Ilin I.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3612-393X>

Panteleev M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Ledeneva I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4277-5838>

Shikhaliev Kh.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6576-0305>

Литература

- Macfarlane R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202: 498–99.
- Matafonov A., Cheng Q., Geng Y., Verhamme I.M., Umunakwe O., Tucker E.I., et al. Evidence for factor IX-independent roles for factor XIa in blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2118–27.
- 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; 10: e0116665.
- Meijers J.C.M. Feedback controversy stops here. *Blood* 2009; 114: 235.
- Gailani D., Bane C.E., Gruber A. Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1383–95.

6. Panteleev M.A., Dashkevich N.M., Ataullakhanov F.I. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: Roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015; 136: 699–711.
7. Panteleev M.A., Ovanesov M.V., Kireev D.A., Shibeko A.M., Sinauridze E.I., Ananyeva N.M., et al. Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively. *Biophys J* 2006; 90: 1489–500.
8. Dashkevich N.M., Ovanesov M.V., Balandina A.N., Karamzin S.S., Shestakov P.I., Soshitova N.P., et al. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys J* 2012; 103: 2233–40.
9. Sinauridze E.I., Panteleev M.A., Ataullakhanov F.I. Anticoagulant therapy: basic principles, classic approaches and recent developments. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23: 482–93.
10. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 2008; 451: 914–18.
11. Shibeko A.M., Lobanova E.S., Panteleev M.A., Ataullakhanov F.I. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa. *BMC Syst Biol* 2010; 4: 5.
12. Tokarev A.A., Butylin A.A., Ataullakhanov F.I. Platelet Adhesion from Shear Blood Flow Is Controlled by Near-Wall Rebounding Collisions with Erythrocytes. *Biophys J* 2011; 100: 799–808.
13. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., et al. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 2045–57.
14. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y., et al. Blood coagulation factors bound to procoagulant platelets are concentrated in their cap structures to promote clotting. *Blood* 2016; 128: 1745–56.
15. 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: 1216–27.
16. Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2545–53.
17. Davi G., Patrono C. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2482–94.
18. Bonaca M.P., Bhatt D.L., Steg P.G., Storey R.F., Cohen M., Im K., et al. Ischaemic risk and efficacy of ticagrelor in relation to time from P2Y₁₂ inhibitor withdrawal in patients with prior myocardial infarction: insights from PEGASUS-TIMI 54. *Eur Heart J* 2016; 37: 1133–42.
19. Hiatt W.R., Fowkes F.G.R., Heizer G., Berger J.S., Baumgartner I., Held P., et al. Ticagrelor versus Clopidogrel in Symptomatic Peripheral Artery Disease. *N Engl J Med* 2017; 376: 32–40.
20. Rothberg M.B., Celestin C., Fiore L.D., Lawler E., Cook J.R. Warfarin plus aspirin after myocardial infarction or the acute coronary syndrome: meta-analysis with estimates of risk and benefit. *Ann Intern Med* 2005; 143: 241–50.
21. Mega J.L., Braunwald E., Wiviott S.D., Bassand J.-P., Bhatt D.L., Bode C., et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012; 366: 9–19.
22. Virchow R.L.K. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt am Main: 1856.
23. Friedman M.H., Brinkman A.M., Qin J.J., Seed W.A. Relation between coronary artery geometry and the distribution of early sudanophilic lesions. *Atherosclerosis* 1993; 98: 193–9.
24. von Brühl M.-L., Stark K., Steinhart A., Chandraratne S., Konrad I., Lorenz M., et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012; 209: 819–35.
25. Swystun L.L., Liaw P.C. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood* 2016; 128: 753–62.
26. Moosbauer C., Morgenstern E., Cuvelier S.L., Manukyan D., Bidzhekov K., Albrecht S., et al. Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 2007; 109: 995–1002.
27. Uderhardt S., Ackermann J.A., Fillep T., Hammond V.J., Willeit J., Santer P., et al. Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *J Exp Med* 2017; 214: 2121–38.
28. Longstaff C., Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2015; 13: S98–105.
29. Longstaff C., Varjú I., Sótonyi P., Szabó L., Krumrey M., Hoell A., et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem* 2013; 288: 6946–56.
30. Reimers R.C., Suter S.P., Joist J.H. Potentiation by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanisms. *Blood* 1984; 64: 1200–6.
31. Goel M.S., Diamond S.L. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. *Blood* 2002; 100: 3797–803.
32. Whelihan M.F., Lim M.Y., Mooberry M.J., Piegore M.G., Ilich A., Wogu A., et al. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 1941–52.
33. Kwaan H.C. Microvascular thrombosis: a serious and deadly pathologic process in multiple diseases. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37: 961–78.
34. Levi M., Schultz M., van der Poll T. Sepsis and thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost* 2013; 39: 559–66.
35. May F., Krupka J., Fries M., Thielmann I., Pragst I., Weimer T., et al. FXIIa inhibitor rHA-Infestin-4: Safe thromboprotection in experimental venous, arterial and foreign surface-induced thrombosis. *Br J Haematol* 2016; 173: 769–78.
36. Larsson M., Rayzman V., Nolte M.W., Nickel K.F., Björkqvist J., Jämsä A., et al. A factor XIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk. *Sci Transl Med* 2014; 6: 222ra17.

37. David T., Kim Y.C., Ely L.K., Rondon I., Gao H., O'Brien P., et al. Factor XIa-specific IgG and a reversal agent to probe factor XI function in thrombosis and hemostasis. *Sci Transl Med* 2016; 8: 353ra112.
38. Büller H.R., Bethune C., Bhanot S., Gailani D., Monia B.P., Raskob G.E., et al. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med* 2015; 372: 232–40.
39. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 235–42.
40. Садовничий В.А., Сулимов В.Б. Суперкомпьютерные технологии в медицине. Суперкомпьютерные технологии в науке, образовании и промышленности. – М.: Изд-во Московского университета 2009; 1: 16–23.
41. Gupta M., Sharma R., Kumar A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Comput Biol Chem* 2018; 76: 210–17.
42. Сулимов В.Б., Сулимов А.В. Докинг: молекулярное моделирование для разработки лекарств. – М.: ИИнтелл, 2017.
43. Сулимов А.В., Кутов Д.К., Каткова Е.В., Кондакова О.А., Сулимов В.Б. Поиск подходов к улучшению точности расчетов энергии связывания белок-лиганд с помощью докинга. *Известия Академии наук. Серия химическая* 2017: 1913–24.
44. Chen Y.C. Beware of docking! *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36: 78–95.
45. Yuriev E., Holien J., Ramsland P.A. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012–2013 in review. *J Mol Recognit* 2015; 28: 581–604.
46. Pagadala N.S., Syed K., Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev* 2017; 9: 91–102.
47. Sulimov V.B., Kutov D.C., Sulimov A.V. *Advances in Docking*. *Curr Med Chem* 2019; 26: 1–25.
48. Сулимов А.В., Кутов Д.К., Тащилова А.С., Ильин И.С., Подоплелова Н.А. Пантелева М.А. и др. Современные методы разработки новых лекарственных средств, влияющих на систему гемостаза. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 18: 136–52.
49. Sulimov A.V., Kutov D.C., Oferkin I.V., Katkova E.V., Sulimov V.B. Application of the docking program SOL for CSAR benchmark. *J Chem Inf Model* 2013; 53: 1946–56.
50. Patel N.R., Patel D.V., Murumkar P.R., Yadav M.R. Contemporary developments in the discovery of selective factor Xa inhibitors: A review. *Eur J Med Chem* 2016; 121: 671–98.
51. Кабанкин А.С., Синауридзе Е.И., Липец Е.Н., Атауллаханов Ф.И. Компьютерный дизайн низкомолекулярных ингибиторов факторов системы свертывания крови. *Биохимия* 2019; 84: 191–211.
52. Lagos C.F., Segovia G.F., Nuñez-Navarro N., Faúndez M.A., Zacconi F.C. Novel FXa Inhibitor Identification through Integration of Ligand- and Structure-Based Approaches. *Molecules* 2017; 22: 1588.
53. Pu Y., Liu H., Zhou Y., Peng J., Li Y., Li P., et al. In silico Discovery of Novel FXa Inhibitors by Pharmacophore Modeling and Molecular Docking. *Nat Products Bioprospect* 2017; 7: 249–56.
54. Xing J., Yang L., Li H., Li Q., Zhao L., Wang X., et al. Identification of anthranilamide derivatives as potential factor Xa inhibitors: drug design, synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem* 2015; 95: 388–99.
55. Sulimov V.B., Gribkova I.V., Kochugava M.P., Katkova E.V., Sulimov A.V., Kutov D.C., et al. Application of Molecular Modeling to Development of New Factor Xa Inhibitors. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 120802.
56. Ilin I., Lipets E., Sulimov A., Kutov D., Shikhaliev K., Potapov A., et al. New factor Xa inhibitors based on 1,2,3,4-tetrahydroquinoline developed by molecular modelling. *J Mol Graph Model* 2019; 89: 215–24.
57. Levy J.H., Douketis J., Weitz J.I. Reversal agents for non-vitamin K antagonist oral anticoagulants. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15: 273–81.
58. Quan M.L., Wong P.C., Wang C., Woerner F., Smallheer J.M., Barbera F.A., et al. Tetrahydroquinoline derivatives as potent and selective factor Xla inhibitors. *J Med Chem* 2014; 57: 955–69.
59. Wong P.C., Quan M.L., Watson C.A., Crain E.J., Harpel M.R., Rendina A.R., et al. In vitro, antithrombotic and bleeding time studies of BMS-654457, a small-molecule, reversible and direct inhibitor of factor XIa. *J Thromb Thrombolysis* 2015; 40: 416–23.
60. Pinto D.J.P., Orwat M.J., Smith L.M., Quan M.L., Lam P.Y.S., Rossi K.A., et al. Discovery of a Parenteral Small Molecule Coagulation Factor XIa Inhibitor Clinical Candidate (BMS-962212). *J Med Chem* 2017; 60: 9703–23.
61. Fjellström O., Akkaya S., Beisel H.-G., Eriksson P.-O., Erixon K., Gustafsson D., et al. Creating novel activated factor XI inhibitors through fragment based lead generation and structure aided drug design. *PLoS One* 2015; 10: e0113705.
62. Pinto D.J.P., Smallheer J.M., Corte J.R., Austin E.J.D., Wang C., Fang T., et al. Structure-based design of inhibitors of coagulation factor XIa with novel P1 moieties. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25: 1635–42.
63. Hu Z., Wang C., Han W., Rossi K.A., Bozarth J.M., Wu Y., et al. Pyridazine and pyridazinone derivatives as potent and selective factor XIa inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2018; 28: 987–92.
64. Corte J.R., Fang T., Hangeland J.J., Friends T.J., Rendina A.R., Luetzgen J.M., et al. Pyridine and pyridinone-based factor XIa inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25: 925–30.
65. Corte J.R., Fang T., Pinto D.J.P., Orwat M.J., Rendina A.R., Luetzgen J.M., et al. Orally bioavailable pyridine and pyrimidine-based Factor XIa inhibitors: Discovery of the methyl N-phenyl carbamate P2 prime group. *Bioorg Med Chem* 2016; 24: 2257–72.
66. Smith L.M., Orwat M.J., Hu Z., Han W., Wang C., Rossi K.A., et al. Novel phenylalanine derived diamides as Factor XIa inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2016; 26: 472–8.
67. Buchanan M.S., Carroll A.R., Wessling D., Jobling M., Avery V.M., Davis R.A., et al. Clavatadine A, a natural product with selective recognition and irreversible inhibition of factor XIa. *J Med Chem* 2008; 51: 3583–7.
68. Obaidullah A.J., Al-Horani R.A. Discovery of Chromen-7-yl Furan-2-Carboxylate as a Potent and Selective Factor XIa Inhibitor. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med Chem* 2017; 15: 40–8.

69. Shi J., Ewing W.R., Nielsen L., Hu Z., Quan M.L. US20170283403A1 – Diamide macrocycles that are fxa inhibitors. 2017.
70. Shi J., Ewing W.R., Pinto D.J.P. WO2017151746A1 – Diamide macrocycles having factor xia inhibiting activity. 2017.
71. Pinto D.J.P., Clarke C.G., Smith I.L.M., Orwat M.J., Jeon Y., Corte J.R. US20160145263A1 – Tetrahydroisoquinolines containing substituted azoles as factor xia inhibitors. 2016.
72. Pinto D.J.P., Smallheer J.M., Corte J.R., Hu Z., Cavallaro C.L., Gilligan P.J., et al. US20120270853A1-Arylpropionamide, acrylamide, arylpropynamide, or arylmethyleurea analogs as factor xia inhibitors. 2012.
73. Corte J.R., Gilligan P.J., Wang Y., Yang W., Ewing W.R., Pinto D.J.P. MX2015000919A – Dihydropyridone p1 as factor xia inhibitors. 2015.
74. Quan M.L., Pinto D.J.P., Smallheer J.M., Ewing W.R., Rossi K.A., Luettgen J.M., et al. Factor Xla Inhibitors as New Anticoagulants. *J Med Chem* 2018; 61: 7425–47.
75. Bane C.E., Gailani D. Factor XI as a target for antithrombotic therapy. *Drug Discov Today* 2014; 19: 1454–8.
76. Al-Horani R.A., Desai U.R. Factor Xla inhibitors: A review of the patent literature. *Expert Opin Ther Pat* 2016; 26: 323–45.
77. Al-Horani R.A., Desai U.R. Designing allosteric inhibitors of factor Xla. Lessons from the interactions of sulfated pentagalloylglucopyranosides. *J Med Chem* 2014; 57: 4805–18.
78. Al-Horani R.A., Gailani D., Desai U.R. Allosteric inhibition of factor Xla. Sulfated non-saccharide glycosaminoglycan mimetics as promising anticoagulants. *Thromb Res* 2015; 136: 379–87.
79. Wong P.C., Crain E.J., Watson C.A., Schumacher W.A. A small-molecule factor Xla inhibitor produces antithrombotic efficacy with minimal bleeding time prolongation in rabbits. *J Thromb Thrombolysis* 2011; 32: 129–37.
80. Hanessian S., Larsson A., Fex T., Knecht W., Blomberg N. Design and synthesis of macrocyclic indoles targeting blood coagulation cascade Factor Xla. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 6925–8.
81. Sakai M., Hagio T., Koyama S., Gohda M., Suzuki K., Ono T., et al. Antithrombotic effect of ONO-8610539, a new, potent and selective small molecule factor Xla inhibitor, in a monkey model of arteriovenous shunt. *J Thromb Haemost* 2015; 13 (Suppl. 2): 230–1.
82. Mori M., Goto T., Shintome M., Toda M., Taga S., Matsushita K., et al. DSR-130787, a novel orally-active factor Xla inhibitor with low risk of bleeding: P0173-TUE. *J Thromb Haemost* 2015; 13 (Suppl. 2): 570–1.
83. Bethune C., Walsh M., Jung B., Yu R., Geary R.S., Bhanot S. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ionis-FX-IRx, an Antisense Inhibitor of Factor XI, in Patients with End-Stage Renal Disease on Hemodialysis. *Blood* 2017; 130: 1116.
84. Buchmuller A., Wilmen A., Strassburger J., Schmidt M.V., Laux V. The anti-factor Xla antibody BAY 1213790 is a novel anticoagulant that shows strong antithrombotic efficacy without an increased risk of bleeding in rabbit models. *Res. Pr Thromb Haemost* 2017; 1 (Suppl. 1): 355.
85. Cheng Q., Tucker E.I., Pine M.S., Sisler I., Matafonov A., Sun M., et al. A role for factor Xla-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood* 2010; 116: 3981–9.
86. Lazarova T.I., Jin L., Rynkiewicz M., Gorga J.C., Bibbins F., Meyers H.V., et al. Synthesis and in vitro biological evaluation of aryl boronic acids as potential inhibitors of factor Xla. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 5022–2.

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 29.01.2020
Принята к печати 28.02.2020

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-158-166

Рекомендации 2020 года по диагностике и терапии инвазивного аспергиллеза у детей с онкогематологическими заболеваниями

Г.Г. Солопова, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова

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

Инвазивный аспергиллез (ИА) – значимая причина в структуре инфекционной заболеваемости иммунокомпрометированных пациентов детского возраста. Наиболее высок риск развития ИА у пациентов, страдающих гемобластозами, преимущественно острыми миелоидными лейкозами, рецидивами острых лейкозов, и реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Несмотря на современные возможности диагностики, профилактики и лечения, смертность от ИА по-прежнему остается высокой. Известно, что факторами, оказывающими наибольшее влияние на благоприятный исход ИА, являются ранняя диагностика и незамедлительное начало противогрибковой терапии. Международными сообществами разработаны рекомендации по лечению ИА у детей, однако российские рекомендации отсутствуют. Дополнительная проблема, характерная для России, – неудовлетворительный уровень микробиологической диагностики, приводящий либо к убежденности врачей-гематологов в очень низкой заболеваемости инвазивными грибковыми инфекциями, либо к нерациональному назначению противогрибковых препаратов. В данной статье представлен алгоритм диагностики и выбора терапии ИА у иммунокомпрометированных пациентов с учетом особенностей, характерных для детей с онкогематологическими заболеваниями.

Ключевые слова: инвазивный аспергиллез, дети, онкогематология, противогрибковая терапия

Солопова Г.Г. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2020; 19 (1): 158–166.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-158-166

Updated 2020 guidelines for diagnosis and treatment of invasive aspergillosis in children with hematologic malignancy

G.G. Solopova, A.A. Maschan, G.A. Novichkova

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

Invasive aspergillosis (IA) is a major cause of morbidity in immunocompromised children. Patients with acute myeloid leukemia, relapsed acute leukemia and stem cells recipients are at high-risk for IA. Despite improving of diagnosis, prevention and treatment of IA mortality remains high. The main factors for favorable outcome of IA are early diagnosis and prompt appropriate treatment. Currently, few different international guidelines for IA have been developed but there are no Russian recommendations. An additional problem typical for Russia is poor level of microbiological diagnostic leading to underestimated frequency of IA or non-appropriate usage of antifungal drugs. This article presents an algorithm for diagnosis and treatment of IA in immunocompromised patient taking into account the characteristics of children with hematologic malignancy.

Key words: invasive aspergillosis, pediatric patients, hematologic malignancy, antifungal treatment

Solopova G.G., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2020; 19 (1): 158–166.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-158-166

Контактная информация:
Солопова Галина Геннадьевна,
канд. мед. наук, заведующая отделением
инфекционного контроля НМИЦ
детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: galina.solopova@fccho-moscow.ru

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 29.01.2020
Accepted 28.02.2020

Correspondence:
Galina G. Solopova, MD, PhD,
head of infection prevention & control
department of 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: galina.solopova@fccho-moscow.ru

Инвазивные грибковые инфекции (ИГИ), вызванные плесневыми грибами рода *Aspergillus*, – значимая причина тяжелых инфекционных осложнений и смертности иммунокомпрометированных детей. Развитие ИГИ, в том числе инвазивного аспергиллеза (ИА), сопряжено не только с непосредственным риском для жизни пациентов, но и с высоким финансовым уроном

для системы здравоохранения как за счет увеличения стоимости лечения данных инфекционных осложнений, так и за счет нарушения возможностей излечения пациентов от основного заболевания. Сообщается о 3–4-кратном увеличении частоты ИА за последнее десятилетие, что связано в первую очередь с развитием новых медицинских технологий, в том числе проведением различных видов

трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), применением нового поколения таргетных и иммуномодулирующих препаратов, приводящих к развитию выраженной иммуносупрессии. Улучшение диагностических возможностей (современные методы визуализации и лабораторной диагностики) также позволяет достовернее и чаще устанавливать диагноз ИА. Популяцией риска являются пациенты с длительной нейтропенией, гемобластозами, реципиенты аллогенной ТГСК и трансплантации солидных органов, пациенты, получающие терапию глюкокортикостероидами (ГКС). К группе высокого риска (частота развития ИА > 10%) относятся пациенты с острыми миелобластными лейкозами (ОМЛ) и рецидивами или рефрактерным течением острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ). К этой группе относятся также пациенты с первичными иммунодефицитами (ПИД), такими как хроническая гранулематозная болезнь и дефект гена *STAT*, для которых характерно развитие ИГИ, в первую очередь ИА. Согласно моноцентровому исследованию наибольшая частота ИА встречалась у пациентов с первичными формами или рецидивами ОМЛ (до 28%), рецидивами ОЛЛ (9%) и первичными ОЛЛ (2%) [1–4].

Первичным очагом поражения чаще становятся легкие, реже диагностируют поражение придаточных пазух носа (ППН), центральной нервной системы (ЦНС) и диссеминированные формы ИА. В отличие от взрослых у детей чаще встречается первичное поражение кожи и мягких тканей, характеризующееся благоприятным течением и прогнозом. Наиболее частый изолят при поражении легких – *Aspergillus fumigatus*, при поражении кожи – *Aspergillus flavus*, у пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) – *Aspergillus nidulans*. Несмотря на улучшение возможностей профилактики и лечения, развитие ИА сопряжено с высокой смертностью, достигающей у детей с гемобластозами и реципиентов ТГСК 45–80% согласно различным исследованиям. У пациентов с ОМЛ и ОЛЛ развитие ИА может приводить к 5-кратному и 14-кратному увеличению смертности соответственно [2, 3, 5].

Клиника. Клинические симптомы ИА у иммунокомпromетированных детей неспецифичны и зачастую схожи с проявлениями инфекций другой этиологии. Одним из важных симптомов, позволяющих заподозрить ИА, может быть фебрильная нейтропения, рефрактерная к проведению антибактериальной терапии препаратами широкого спектра действия. Основные клинические проявления зависят от локализации инфекционного процесса. Поскольку развитие аспергиллеза в основном связано с вдыханием спор грибов рода *Aspergillus* и попаданием их на слизистые оболочки верхних и нижних дыха-

тельных путей, легкие и ППН наиболее часто становятся первичным очагом поражения. При отсутствии эффективного иммунного ответа попадание спор приводит к формированию гифов мицелия, поражению тканей и прорастанию в сосуды. Известно, что диссеминация ИА происходит гематогенным путем: вследствие развития артериального тромбоза и кровоизлияния в первичном очаге поражения формируется некроз с последующим распространением гифов мицелия в различные органы и ткани. При ИА наиболее часто поражаются легкие с развитием следующего комплекса симптомов: кашель, кровохаркание, жалобы на боль в грудной клетке или в боку.

Клинические проявления поражения ППН: заложенность носового дыхания, отделяемое из носа, головные боли или боли, иррадиирующие в лицо, выраженная локальная отечность и гиперемия кожных покровов. Поражение ЦНС встречается с частотой до 30% и проявляется развитием сонливости, судорог, нарушения сознания или локальной неврологической симптоматики. Поражение кожи и мягких тканей чаще наблюдается именно в детской популяции как следствие локальной травмы и контаминации либо гематогенной диссеминации ИА. Клинически кожные поражения могут варьировать от язвенных элементов до папулезных и инфильтративно-некротических изменений [2–4, 6–8].

Диагностика инвазивного аспергиллеза

Раннее установление диагноза ИГИ критически важно, поскольку исход терапии напрямую зависит от быстрого начала правильных действий. Однако диагностика ИГИ у детей зачастую сложна в связи с неспецифичностью клинических проявлений, отсроченным проведением радиологических исследований и предпочтением врачей-гематологов не выполнять инвазивные диагностические процедуры.

Методы визуализации. Показаниями к выполнению компьютерной томографии (КТ) высокого разрешения у детей, находящихся в нейтропении, являются стойкий фебрилитет в течение 72–96 ч, несмотря на проводимую антибактериальную терапию препаратами широкого спектра действия, вторая волна лихорадки после достигнутого ранее афебрилитета или развитие клинических симптомов, встречающихся при ИА.

Известно, что у пациентов в нейтропении рентгенография имеет низкие диагностические возможности, результаты исследования значительно «запаздывают» в сравнении с данными КТ. На рисунках 1, 2 представлены результаты КТ и рентгенограммы органов грудной клетки пациентов в случае вероятного развития ИА легких, демонстрирующие отсутствие признаков поражения легких

на рентгенограммах и наличие выраженных изменений на КТ. Методами визуализации, обладающими высокой чувствительностью, являются КТ, магнитно-резонансная томография (МРТ) и позитронно-эмиссионная КТ (ПЭТ–КТ). Однако стоит уточнить, что интерпретация результатов исследований МРТ и ПЭТ–КТ может быть затруднена ввиду редкого их проведения у детей с инфекционными осложнениями. Таким образом, однозначно рекомендованным методом визуализации, позволяющим установить диагноз ИГИ, является КТ высокого разрешения [2, 3, 6, 8]. Полученные при визуализации данные помогают выявить первичный очаг, определить объем поражения и дальнейшую диагностическую тактику в отношении выбора образца биоматериала – бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) или биопсия, а также контролировать ответ на проводимую противогрибковую терапию.

Большинство опубликованных литературных обзоров посвящено исследованиям, проведенным на взрослой популяции пациентов. Радиологи-

ческие изменения у детей могут значительно отличаться от таковых у взрослых, в частности, при аспергиллезе у детей намного реже можно выявить характерные для него признаки (симптом венца «*halo*», симптом полумесяца и др.). Учитывая, что у детей выявленные изменения часто неспецифичны и по совокупности клинико-радиологических данных можно лишь предположить генез поражения, для установления диагноза рекомендовано проведение БАЛ и исследование лаважной жидкости. Важно помнить, что результаты диагностических исследований наиболее достоверны при выполнении их в максимально короткие сроки от момента возникновения симптомов и начала противомикробной терапии. При развитии поражения придаточных пазух носа, кожи и других органов большая роль в диагностике ИГИ отводится инвазивным манипуляциям, таким как пункция и биопсия, в том числе с применением эндоскопической техники [9]. При определении диагностической тактики необхо-

Рисунок 1 А

Рентгенограмма органов грудной клетки пациента № 1 с инвазивным аспергиллезом легких

Figure 1 A

Chest X-Ray of a patient № 1 with IA

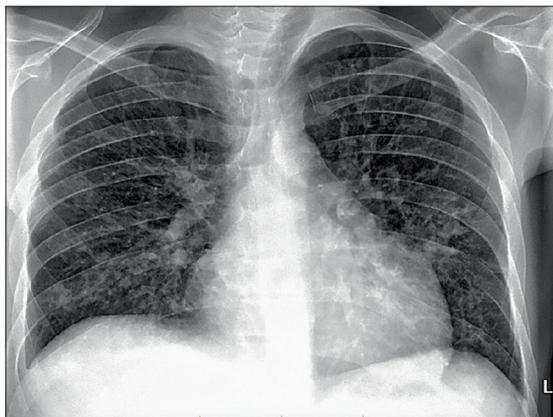


Рисунок 1 Б

Компьютерная томограмма органов грудной клетки пациента № 1 с инвазивным аспергиллезом легких

Figure 1 Б

Chest CT of a patient № 1 with invasive aspergillosis



Рисунок 2 А

Рентгенограмма органов грудной клетки пациента № 2 с инвазивным аспергиллезом легких

Figure 2 A

Chest X-Ray of a patient № 2 with IA

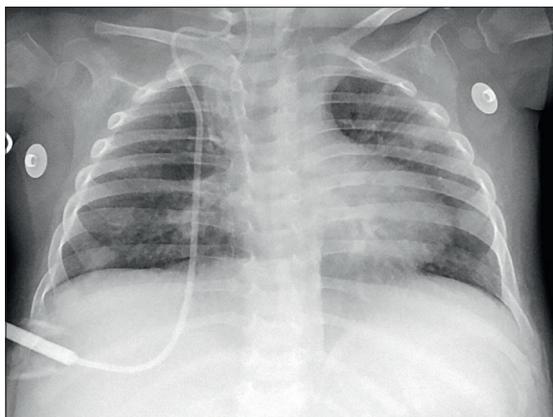
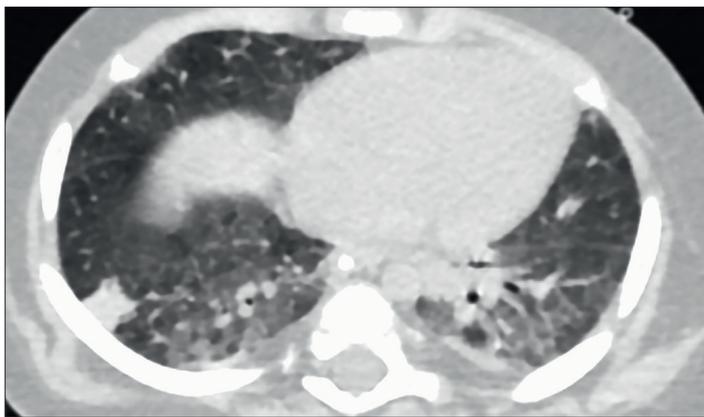


Рисунок 2 Б

Компьютерная томограмма органов грудной клетки пациента № 2 с инвазивным аспергиллезом легких

Figure 2 Б

Chest CT of a patient № 2 with invasive aspergillosis



димо оценить соотношение польза/риск для жизни пациента.

Микробиологическая диагностика. При подозрении на развитие ИА, особенно у пациентов группы высокого риска, для диагностики необходимо исследовать все возможные биологические субстраты. В лабораториях, получающих материал от иммунокомпрометированных пациентов, необходимо проводить активный поиск дрожжевых и плесневых грибов. Полноценное исследование можно выполнить только в том случае, если клинический материал не измельчен и не высушен. Для этого мазок, взятый тупфером с пораженной поверхности, необходимо поместить в транспортную питательную среду, а материал, полученный с помощью инвазивных манипуляций (БАЛ, аспират, биоптат и др.), – в стерильную емкость с небольшим количеством физиологического раствора (не в фиксирующий раствор). При подозрении на развитие ИГИ максимально быстро должна быть проведена люминесцентная микроскопия биологического материала с использованием калькофлюора белого (КФБ). С помощью люминесцентной микроскопии можно оценить такие характеристики, как структура мицелия, толщина гифов, наличие септ, тип ветвления.

Для грибов рода *Aspergillus* характерны следующие признаки: тонкостенный мицелий толщиной 3–5 мкм в диаметре, ветвящийся дихотомически под углом 45° и имеющий регулярное септирование (рисунок 3). Учитывая скорость проведения микроскопии, а также тот факт, что лабораторное куль-

Рисунок 3

Микроскопия жидкости БАЛ с окраской КФБ (ув. × 1000): тонкий септированный мицелий, ветвящийся под углом 45°

Figure 3

CFW stain of BAL (enlargement × 1000): thin septate hyphae, branching in 45°



тивирование плесневых грибов даже при их наличии результативно лишь в 50–70% случаев, данный метод следует обязательно применять для диагностики ИГИ. Культивировать грибы необходимо в разных температурных режимах, предпочтительно на питательной среде Сабуро (как плотном агаре, так и в бульоне). После получения роста колоний грибов они должны быть идентифицированы, что на сегодняшний день возможно с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI TOF) при инсталлировании микологической базы данных. Оптимально определение чувствительности грибов к основным противогрибковым препаратам (вориконазол, позаконазол, амфотерицин В), что можно выполнить диффузионными методами или методом микроразведений [2, 4, 9–11].

Серологическая диагностика. Галактоманнан (ГМ) – это полисахарид, входящий в состав клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*. Принято определять ГМ в сыворотке крови или жидкости БАЛ. Однако необходимо принимать во внимание, что у пациентов без нейтропении или получающих противогрибковую терапию препаратами, активными в отношении плесневых грибов, чувствительность данного метода исследования очень низкая. У пациентов, находящихся в нейтропении и не получающих противогрибковую профилактику, исследование уровня ГМ высокочувствительно и обладает высоким негативным предсказательным уровнем (*Negative Predictive Value*).

Согласно рекомендациям Американского сообщества по инфекционным болезням (*Infectious Diseases Society of America – IDSA*) и Европейского сообщества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – ESCMID*) для диагностики ИА у детей, находящихся в нейтропении, однозначно рекомендовано определение уровня ГМ в сыворотке крови или жидкости БАЛ. На сегодняшний день общепризнано использование тест-системы *Platelia™ BioRad*, получившей регистрационное удостоверение в России. Галактоманнан считается положительным при индексе оптической плотности более 0,5 в сыворотке крови и более 1 – в жидкости БАЛ. Пациентам, не получающим противогрибковую профилактику препаратами, активными в отношении плесневых грибов, может быть рекомендован еженедельный мониторинг уровня ГМ в сыворотке крови в период нейтропении [1–3, 9, 11, 12].

Критерии диагноза ИА. На основании комплексной оценки клинических, радиологических и лабораторных признаков диагноз ИА может быть установлен с разным уровнем достоверности – возможным, вероятным или доказанным [12, 13].

Диагноз «возможный ИА» устанавливают на основании комплекса только клинических данных: стойкая фебрильная нейтропения более 72–96 ч, несмотря на проводимую антибактериальную терапию широкого спектра действия у пациентов с факторами риска развития ИА, без лабораторно-инструментального подтверждения. Диагноз «вероятный ИА» устанавливают на основании комбинации клинико-лабораторных данных. Согласно обновленным критериям диагностики ИГИ вероятный ИА регистрируют при выявлении у пациентов с факторами риска ИА инфильтративных изменений на КТ органов грудной клетки – как неспецифических, так и более специфических для ИА (либо изменений при выполнении КТ/МРТ ППН или ЦНС в зависимости от наличия той или иной локализации поражения), и/или при выявлении микологических признаков из нестерильных локусов, таких как жидкость БАЛ, трахеобронхиальный аспират и др. Диагноз «доказанный ИА» установить сложнее, так как для этого требуется гистопатологическое или микробиологическое исследование биоптатов стерильных органов и тканей при наличии признаков их поражения. Под микологическими признаками понимают следующие: обнаружение элементов мицелия плесневых грибов при микроскопии или гистологическом исследовании; идентификация культуры грибов; выявление суррогатных маркеров, таких как ГМ. Для диагностики ИА рекомендовано также проведение молекулярно-биологических исследований стерильных образцов тканей (например, кровь, биоптат), однако следует отметить, что в России нет валидированных тест-систем для клинических исследований [14].

Терапия инвазивного аспергиллеза

Для уменьшения частоты развития ИА и улучшения исхода лечения пациентов с онкогематологическими заболеваниями разработаны различные стратегии. Большинство экспертов в области лечения инфекционных осложнений у иммунокомпрометированных пациентов склоняется к необходимости назначения противогрибковой профилактики пациентам с высоким риском развития ИА [15, 16].

Профилактическое назначение препаратов, обладающих активностью в отношении плесневых грибов, необходимо пациентам, относящимся к группе высокого риска с вероятностью развития ИА более 10%. К группе высокого риска относятся пациенты с ОМЛ, ОЛЛ при развитии рецидива или рефрактерном течении заболевания, пациенты с длительным течением глубокого агранулоцитоза (миелодиспластический синдром, сверхтяжелая апластическая анемия), пациенты с хронической

гранулематозной болезнью, а также реципиенты аллогенных ТГСК до приживления гранулоцитарного ростка кроветворения или после его приживления при развитии реакции «трансплантат против хозяина» 3–4-й степени [1–4, 12, 13]. Дополнительным фактором для назначения противогрибковой профилактики могут быть данные локальной эпидемиологической обстановки. Согласно рекомендациям ESCMID препаратами для профилактического назначения являются вориконазол (для детей старше 2 лет) и позаконазол (для детей старше 12 лет) с обязательным мониторингом их концентрации в крови. Эффективной терапевтической концентрацией вориконазола в сыворотке крови считается 1,0–5,0 мкг/мл; позаконазола – 0,7–5,0 мкг/мл [17]. Исключением, позволяющим не проводить лекарственный мониторинг, может быть только прием препарата позаконазол в форме таблеток, учитывая их высокую биодоступность. В исследовании *P. Soler-Palacin* и соавт. продемонстрировано, что при проведении лекарственного мониторинга у 50% детей концентрация препарата в крови составляла менее 1 мг/л; в 73% случаев требовалось изменение дозы вориконазола: медиана дозы у детей младше 5 лет составила 38 мг/кг/сут; у детей старше 5 лет – 15 мг/кг/сут [18].

При наличии у пациента противопоказаний к назначению азолов или при их непереносимости в качестве альтернативы может быть назначен препарат из группы эхинокандинов (микафунгин) или липосомальная форма амфотерицина В. Пациентам с хронической гранулематозной болезнью рекомендован прием итраконазола или позаконазола с проведением терапевтического мониторинга.

Вторичная профилактика показана при наличии ранее установленного диагноза ИА, так как риск рецидива ИГИ у пациентов с гемобластозами или реципиентов аллогенной ТГСК составляет 30–50%. Вторичная профилактика однозначно рекомендована и должна проводиться эффективным ранее препаратом до окончания нейтропении или приема иммуносупрессивной терапии.

При подозрении на развитие ИА рекомендации всех экспертов сводятся к необходимости ранней диагностики и быстрому началу терапии [2–4, 13, 19, 20]. Стратегия лечения ИА включает терапию, основанную на шкале достоверности диагноза ИА, – эмпирическую, упредительную (*preemptive*) или целенаправленную, контроль основного заболевания (отмена или уменьшение дозы ГКС, уменьшение длительности периода нейтропении, в том числе назначение гранулоцитарных колониестимулирующих факторов (Г-КСФ), трансфузии донорских гранулоцитов), а также проведение хирургического вмешательства при наличии показаний.

Эмпирическую противогрибковую терапию назначают пациентам группы высокого риска при сохранении фебрильной нейтропении в течение 72–96 ч, несмотря на проводимую антибактериальную терапию широкого спектра действия, а также при развитии второй волны лихорадки после достигнутого ранее афебрилитета. Согласно международным рекомендациям различных экспертных групп препаратами выбора являются препарат из группы эхинокандинов (каспофунгин) или липосомальная форма амфотерицина В. Продолжать эмпирическую терапию следует до выхода пациента из агранулоцитоза. Упреждающую противогрибковую терапию назначают при выявлении у пациента клинико-лабораторных признаков вероятного ИА согласно критериям Европейской организации по изучению и лечению рака (EORTC). Целенаправленная противогрибковая терапия рекомендована при выполнении критериев доказанного микоза – микробиологической или морфологической идентификации мицелия грибов из стерильных в норме тканей.

В качестве препарата первой линии терапии ИА детям старше 2 лет однозначно рекомендован вориконазол; при этом для пациентов с 2 до 12 лет или с 12 до 14 лет при массе тела менее 50 кг доза препарата составляет 8 мг/кг каждые 12 ч (в первые сутки – 9 мг/кг каждые 12 ч); для пациентов старше 15 лет или с 12 до 14 лет при массе тела более 50 кг доза составляет 4 мг/кг каждые 12 ч (в первые сутки – 6 мг/кг каждые 12 ч). Показано, что при пероральном приеме вориконазола чаще отмечается низкий уровень препарата в крови, в связи с чем терапию всегда начинают с внутривенной формы. Препаратами выбора для лечения аспергиллеза могут быть также следующие формы амфотерицина В: липосомальная в дозе 3 мг/кг/сут (Амбизом®) или липидная в дозе 5 мг/кг/сут (на российском рынке – «Амфолип»).

Монотерапия эхинокандинами в качестве первой линии терапии не показана, тогда как комбинированная терапия вориконазолом и эхинокандином (анидулафунгином) может быть рассмотрена у отдельных пациентов, в том числе при невозможности проведения терапевтического мониторинга [21]. Продолжительность упреждающей и целенаправленной терапии при развитии вероятного или доказанного ИА чаще всего составляет не менее 6–12 недель и при сохранении факторов риска переходит в обязательную вторичную профилактику.

Если на фоне проведения противогрибковой терапии вориконазолом или позаконазолом появились признаки «прорывной» грибковой инфекции, то необходима смена класса препарата, например, азола на липосомальную/липидную форму амфотерицина В.

Собственный алгоритм. Алгоритм противогрибковой терапии был разработан в НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России с целью систематизации и адаптации актуальных международных рекомендаций по диагностике и лечению ИГИ (рисунки 4).

При развитии стойкой фебрильной нейтропении, несмотря на комбинацию карбапенема с аминогликозидом и/или ванкомицином, необходимо решить вопрос о начале эмпирической противогрибковой терапии и провести поиск очага инфекции [22, 23]. В первую очередь следует провести КТ органов грудной клетки – даже при отсутствии какой-либо клинической симптоматики со стороны органов дыхательной системы; от результатов КТ зависит дальнейшая тактика терапии.

В алгоритме представлены три варианта радиологических находок:

- поражение легких I типа: фокусы консолидации легочной ткани с признаками, типичными для ИА (симптомы венца («halo»), воздушной полости, ампутации сосуда – при введении контраста);
- поражение легких II типа: интерстициальное поражение и/или неспецифические мультифокальные изменения;
- отсутствие каких-либо изменений легочной ткани.

При выявлении поражения легких I и II типов алгоритм предусматривает проведение бронхоскопии и БАЛ (при наличии фибринозно-некротических изменений дыхательных путей дополнительно может быть проведена браш-биопсия). Объем исследования лаважной жидкости должен быть максимальным, включая микроскопию с КФБ, окраску по Цилю–Нильсену и микробиологическое исследование на различных питательных средах для выявления бактерий и грибов; молекулярно-биологическое исследование для выявления респираторных вирусов, цитомегаловируса, микобактерий, пневмоцистов, легионеллы, атипичных микроорганизмов; ИФА-диагностику для определения уровня ГМ. Наибольшей диагностической ценностью обладают результаты БАЛ, выполненного в кратчайшие сроки от выявления поражения легких. В отношении исследования ГМ следует уточнить, что его постановка должна быть проведена максимально быстро, а если это невозможно, образец жидкости БАЛ необходимо заморозить до предполагаемого дня постановки.

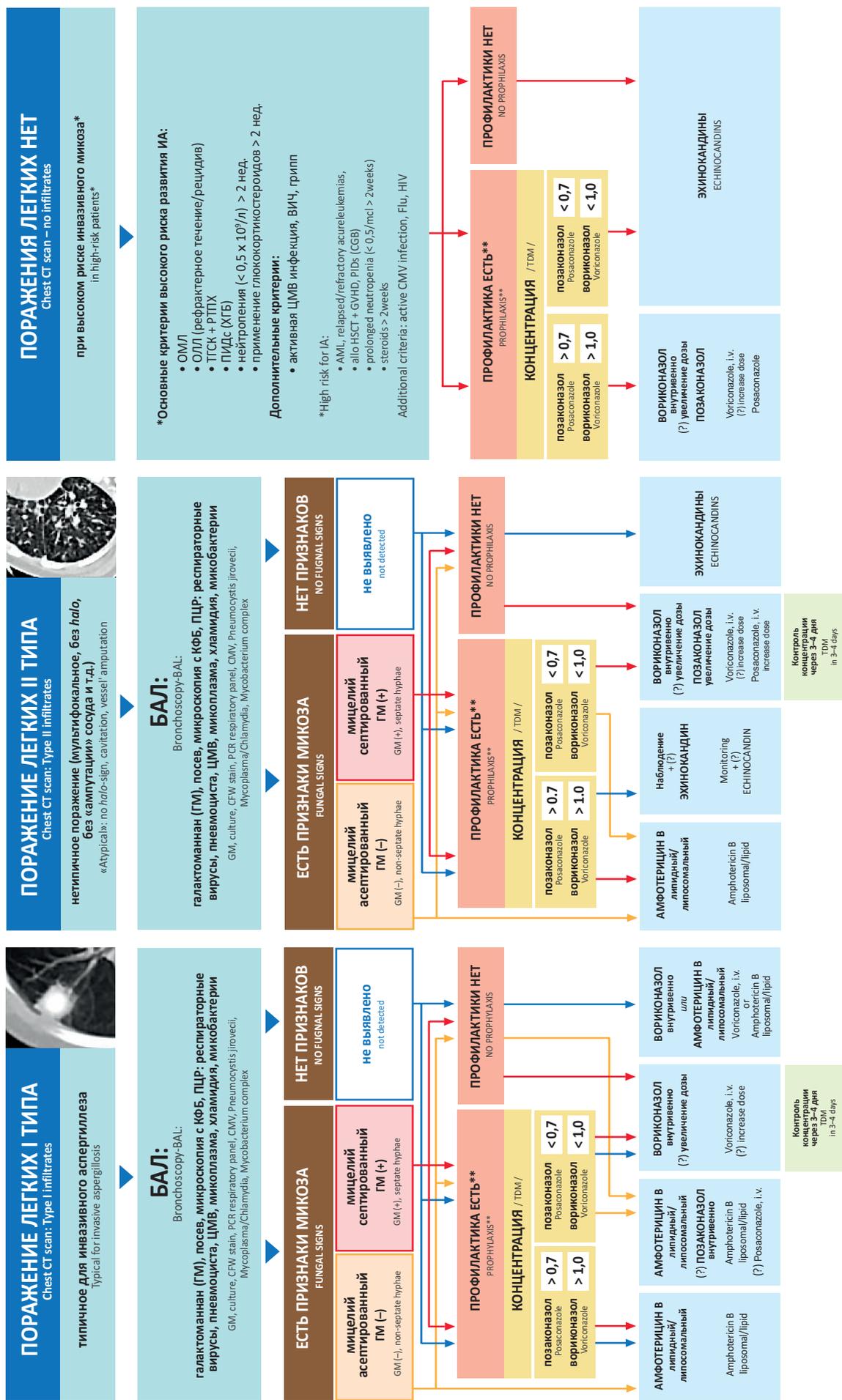
Выбор дальнейшей тактики противогрибковой терапии связан с несколькими факторами: обнаружением микологических признаков и видом предшествующей противогрибковой терапии.

- При выявлении положительного ГМ, и/или септированного мицелия, или микробиологической

АЛГОРИТМ ВЫБОРА ПРОТИВОГРИБКОВОЙ ТЕРАПИИ

THE ALGORITHM FOR THE CHOICE OF ANTIFUNGAL THERAPY

Рисунок 4 / Figure 4



идентификации грибов рода *Aspergillus* показано немедленное начало противогрибковой терапии внутривенной формой вориконазола. Однако, если пациент уже получал профилактику и концентрация вориконазола или позаконазола в крови оказалась терапевтической, то однозначно рекомендована смена класса препарата на липосомальную/липидную форму амфотерицина В. При обнаружении низкой концентрации профилактических препаратов в крови возможен переход на внутривенную форму вориконазола и увеличение дозы под контролем концентрации препарата в крови.

- При подозрении на мукормикоз (отрицательный ГМ в БАЛ и обнаружение несептированного мицелия при микроскопии или микробиологическая идентификация грибов рода *Mucor*) препаратом выбора является липосомальная/липидная форма амфотерицина В с возможной комбинацией с позаконазолом под контролем его концентрации в крови и/или каспифунгином.

- При поражении легких I типа и отсутствии микологических признаков пациентам, ранее не получавшим противогрибковую профилактику, может быть назначен вориконазол или липосомальная/липидная форма амфотерицина В; пациентам, получавшим профилактику, при низкой концентрации показано увеличение дозы и назначение внутривенной формы вориконазола; при терапевтической концентрации – смена на липосомальную/липидную форму амфотерицина В.

- При поражении легких II типа и отсутствии микологических признаков пациентам, ранее не получавшим противогрибковую профилактику, может быть назначен эхинокандин; пациентам, получавшим профилактику, при низкой концентрации показана коррекция дозы; при терапевтической концентрации – наблюдение или добавление эхинокандина.

При выявлении на КТ легких очагов инфильтрации или интерстициальных изменений выбор терапии напрямую зависит от результатов исследования жидкости БАЛ, и в зависимости от полученных результатов может включать антимикробные, противовирусные либо противогрибковые препараты.

В случае отсутствия изменений при проведении визуализации пациенту, не получавшему противогрибковую профилактику препаратами, активными в отношении ИА (позаконазол, вориконазол), может быть инициирована эмпирическая противогрибковая терапия. При проведении предшествующей профилактики показано определение концентрации препарата в крови; в случае выявления низкой концентрации необходимо отменить пероральные формы и назначить вориконазол внутривенно. Если концентрация препарата в крови оказалась терапев-

тической, то необходимо перейти к стратегии эмпирической противогрибковой терапии и назначить препарат из группы эхинокандинов.

В качестве препарата для эмпирической противогрибковой терапии рекомендован также липосомальный амфотерицин В, однако при отсутствии очагов поражения легких его назначение не рационально. В такой ситуации может быть рекомендовано дальнейшее обследование: заборы крови для гемокультивирования, ультразвуковое исследование (УЗИ) клапанов сердца и сосудов верхней полой вены, а также визуализация органов брюшной полости и забрюшинного пространства (УЗИ, МРТ/КТ с контрастом).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный выше алгоритм включает диагностический поиск, цель которого – не только начало противогрибковой терапии, но и ее своевременная модификация. Для диагностики ИГИ важна как осторожность врачей-гематологов, так и подготовленность микробиологической лаборатории к работе с материалом, полученным от иммунокомпрометированных пациентов, в том числе с целью поиска плесневых грибов. Для грамотного выбора препарата, помимо знаний о спектре активности, биодоступности в различные органы и ткани, важно понимание особенностей фармакокинетики препарата у детей, в том числе измерение концентрации азолов в крови. Вориконазол – препарат, рекомендованный всеми международными сообществами для лечения ИА. В некоторых ситуациях возможно назначение комбинированной терапии с эхинокандинами. При развитии ИА на фоне хорошей концентрации вориконазола/позаконазола однозначно рекомендовано назначение липосомальной/липидной формы амфотерицина В. Развитие ИА на фоне терапии амфотерицином В – показание для смены класса препаратов и назначения вориконазола.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена при финансовой поддержке компании *Пфайзер*. Позиция авторов статьи может отличаться от позиции компании *Пфайзер*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Solopova G.G. ORCID: <http://orcid.org/0000-00021680-7269>

Maschan A.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

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

Литература

- Groll A., Castagnola E., Cesaro S., Dalle J.-H., Engelhard D., Hope W., et al. Fourth European Conference on infections in leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *Lancet oncol* 2014; 15: 327–40. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70017-8
- Warris A., Lehrnbecher T., Roilides E., Castagnola E., Brüggemann R.J.M., Groll A. ESCMID-ECMM guidelines: diagnosis and management of invasive aspergillosis in neonates and children. *Clinical Microbiology and Infection* 2019. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.05.019
- Lernbecher T., Hassler A., Groll A.H., Bochennek K. Diagnostic approaches for invasive aspergillosis – specific considerations in the pediatric population. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9(518):1–8. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00518
- Apsemidou A., Petridis N., Vyzantiadis T.-A., Tragiannidis A. Invasive aspergillosis in children: update of current guidelines. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2018; 10 (1): e2018048. DOI: 10.4084/MDHID.2018.048
- Pana Z.D., Roilides E., Warris A., Groll A., Zaoutis T. Epidemiology of invasive fungal disease in children. *JPIDS* 2017; 6 (Suppl 1): 3–11. DOI: 10.1093/jpids/pix046
- Katragkou A., Fisher B., Groll A.H., Roilides E., Walsh T. Diagnostic imaging and invasive fungal diseases in children. *Journal of Pediatric Infectious Diseases Society* 2017; 6 (Suppl 1): 22–31. DOI: 10.1093/jpids/pix055
- King J., Pana Z., Lernbecher T., Steinbach W.J., Warris A. Recognition and clinical presentation of invasive fungal disease in neonates and children. *JPIDS* 2017; 6 (Suppl 1): 12–21. DOI: 10.1093/jpids/pix053
- Anantasit N., Nuntacharruksa N., Incharoen P., Preutthipan A. Clinical and pathological correlation in pediatric invasive pulmonary aspergillosis. *Frontiers in Pediatrics* 2018; 6 (Art 31): 1–6. DOI: 10.3389/fped.2018.00031
- Wattier R., Ramirez-Avila L. Pediatric invasive aspergillosis. *Journal of Fungi* 2016; 2: 19. DOI: 10.3390/jof2020019
- Климко Н.Н., Шадривова О.В., Хостелиди С.Н., Десятик Е.А., Борзова Ю.В., Чернопятова П.М. и соавт. Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования. *Онкогематология* 2014; 2: 13–9.
- Warris A. The European pediatric mycology network (EPMYN): towards a better understanding and management of fungal infections in children. *Curr Fungal Infect Rep* 2016; 10: 7–9.
- Segal B., Herbrecht R., Stevens D., Ostrosky-Zeichner L., Sobel J., Viscoli C., et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer Consensus Criteria. *Clin Infect Dis* 2008 Sep 1; 47 (5): 674–83. DOI: 10.1086/590566
- Donnelly P., Chen S., Kauffman C., Steinbach W., Baddley J., Verweij P., et al. Revision and update of the consensus definitions of the invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium. *Clinical Infectious Diseases* 2019. DOI: 10.1093/cid/ciz1008
- Huppler A.R., Fisher B.T., Lernbecher T., Walsh T., Steinbach W.J. Role of molecular biomarkers in the diagnosis of invasive fungal diseases in children. *JPIDS* 2016; 6 (Suppl 1): 32–44. DOI: 10.1093/jpids/pix054
- Morgan J., Hassan H., Cockle J., Lethaby Ch., James B., Phillips R. Critical review of current clinical practice guidelines for antifungal therapy in paediatric haematology and oncology. *Support Care Cancer* 2017. ISSN 1433–7339. DOI: 10.1007/s00520-016-3412-y
- Wattier R., Dvorak C., Hoffman J., Brozovich A.A., Bin-Hussain I., Groll A., et al. A prospective, international cohort study of invasive mold infections in children. *JPIDS* 2015; 4 (4): 313–22. DOI: 10.1093/jpids/piu074
- Huurneman L., Neely M., Veringa A., Perez F.D., Ramos-Martin V., Tissing W.J., et al. Pharmacodynamics of voriconazole in children: further step along the path to true individualized therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 2336–42.
- Soler-Palacin P., Frick M.A., Martin-Nalda A., Lanasa M., Pou L., Rosello E., et al. Voriconazole drug monitoring in the management of invasive fungal infection in immunocompromised children: a prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 700–6. DOI: 10.1093/jac/dkr517
- Lilienfeld-Toal M., Wagener J., Einsele H., Cornely O.A., Kurzai O. Invasive fungal infection. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116: 271–8. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0271
- Масчан А.А., Клясова Г.А., Веселов А.В. Обзор рекомендаций американского общества по инфекционным болезням по лечению аспергиллеза. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2008; 10 (2): 133–70.
- Qiu K., Liao X., Fang J., Xu H., Li Y., Huang K., Zhou D. Combination antifungal treatment for invasive fungal disease after hematopoietic stem cell transplantation in children with hematological disorders. *Transpl Infect Dis*. 2019; 21:e13066. DOI: 10.1111/tid.13066
- Солопова Г.Г., Новичкова Г.А. Опыт внедрения алгоритма эмпирической антибактериальной терапии при развитии фебрильной нейтропении в Центре детской гематологии/онкологии». *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2017; 16 (3): 35–47.
- Hamdy R., Zaoutis T., Seo S. Antifungal stewardship considerations for adults and pediatrics. *Virulence* 2017; 8 (6): 658–72.