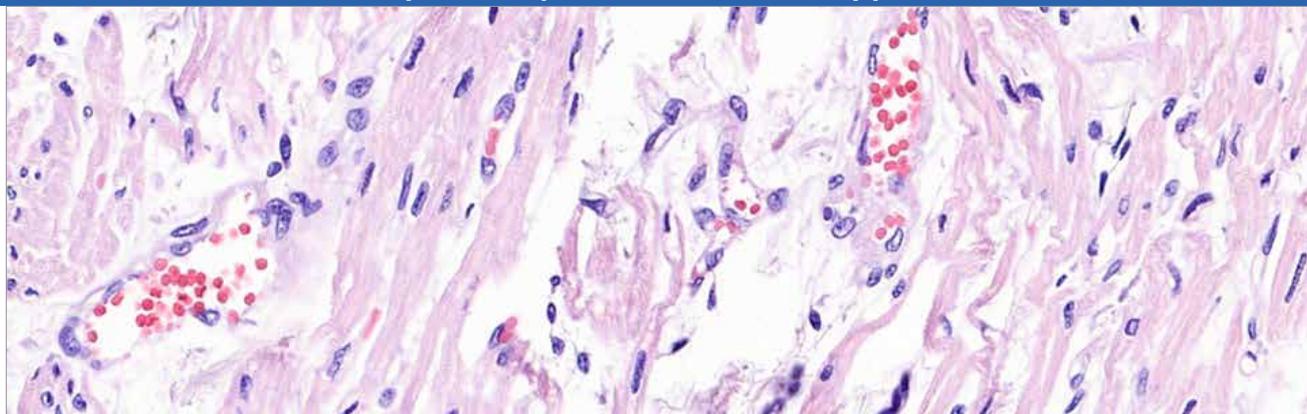


Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии

№ 3 | 22 | 2023

научно-практический журнал



Миокард пациента с острым лимфобластным лейкозом и COVID-19. Периваскулярный отек и диапедезные кровоизлияния. Нарушение архитектоники. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$. Из статьи Г.В. Кондратьева и соавт., с. 166

43

Опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных тромбоцитопатий

A single-center experience of using immunofluorescence staining of blood smears for the diagnosis of hereditary thrombocytopathies

88

Возможность использования гематологического показателя фракции незрелых тромбоцитов при назначении трансфузий тромбоцитарной массы

Using immature platelet fraction as a factor in deciding on the need for platelet transfusions

156

Возрастные изменения характера нарушений функции тромбоцитов у пациентки с *SLFN14*-связанной макротромбоцитопенией

Age-dependent changes in platelet function of a patient with *SLFN14*-related macrothrombocytopenia



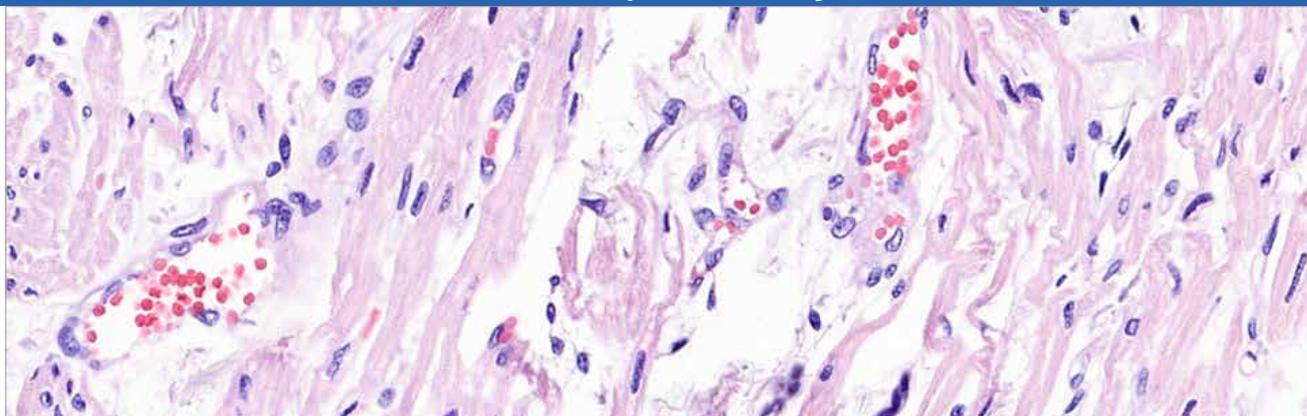
НАУКА —
ДЕТЯМ



Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology

№ 3 | 22 | 2023

scientific and practical journal



The myocardium of a patient with acute lymphoblastic leukemia and COVID-19. Perivascular edema and diapedetic bleeding. Abnormal architecture. Hematoxylin & eosin staining, × 40. From the article by G.V. Kondratiev et al., p. 166

43

A single-center experience of using immunofluorescence staining of blood smears for the diagnosis of hereditary thrombocytopathies

88

Using immature platelet fraction as a factor in deciding on the need for platelet transfusions

156

Age-dependent changes in platelet function of a patient with *SLFN14*-related macrothrombocytopenia



НАУКА —
ДЕТЯМ



A peer-reviewed open-access journal, is published 4 times a year by the Science for Children Foundation for Support and Development in Pediatric Hematology, Oncology and Immunology 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.com

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.

Subject area and/or specialty

An educational medium. An informational research and clinical medical journal featuring original research articles, literature reviews, lectures on relevant topics of pediatric hematology, oncology and immunopathology, and advertisements published in accordance with the Advertising Law of the Russian Federation.

Manuscript Submissions

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

Advertising

To place an advertisement or receive additional information, please contact us via e-mail: 9982222@gmail.com

Commercial Reprints

For commercial reprints, please contact us via e-mail: 9982222@gmail.com

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 © 2023 by «Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology» («D. Rogachev NMRCPHO»). 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*: 17 Vereyskaya St., Room 311–1, Moscow 121357, Russia

For further information on rights and permissions, please contact us via e-mail: 9982222@gmail.com

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.com

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.

Примерная тематика и (или) специализация

Образовательное СМИ. Информационный научно-практический медицинский журнал, публикующий оригинальные исследования, обзоры литературы, лекции, посвященные актуальным вопросам детской гематологии, онкологии и иммунопатологии, рекламу в соответствии с законодательством Российской Федерации о рекламе.

Подача рукописей

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

Размещение рекламных материалов

По вопросам размещения рекламы обращайтесь в редакцию. E-mail: 9982222@gmail.com

Репринт

По вопросам репринта обращайтесь в редакцию. E-mail: 9982222@gmail.com

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

© 2023 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, 121357, Москва, ул. Верейская, 17, пом. 311, комната 1

Для получения более подробной информации, касающейся авторских прав и разрешений, просим связаться с нами по электронной почте: 9982222@gmail.com

Founders

D. Rogachev NMRCPHO,
Science for Children Foundation for Support and Development in Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

Editorial office

Editor-in-Chief – G.A. Novichkova
Address: 17 Vereyskaya St., Room 311–1, Moscow 121357
Tel.: +7 (495) 287-65-70, ext. 5546
www.hemoncim.com
E-mail: journal@fnkc.ru
Advertising department: +7 (495) 211-04-82

The Journal is registered in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media. Registration number is ПИ № ФС77–85163 от 27.04.2023. The journal was founded in 2002. It is published in Russian and English. Distribution area: the Russian Federation, foreign countries.

Publisher

LLC «Science and education».
Address: 28 Podsosenskiy Lane, Bldg. 1, Moscow 101000

Printing office

LLC «PRINT-M».
Address: 28 Podsosenskiy Lane, Bldg. 1, Room 18, Moscow 101000

Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023
Vol. 22, No.3. Date of publication 14.09.2023
The circulation is 3000 copies. The price is free.

Учредители

ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, фонд поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – детям».

Редакция журнала

Главный редактор – Г.А. Новичкова
Адрес: 121357, Москва, ул. Верейская, 17, пом. 311, комната 1
Тел.: +7 (495) 287-65-70, доб. 5546
www.hemoncim.com
E-mail: journal@fnkc.ru
По вопросам рекламы: +7 (495) 211-04-82

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Регистрационный номер ПИ № ФС77–85163 от 27.04.2023. Журнал основан в 2002 году. Языки издания: русский, английский. Территория распространения: Российская Федерация, зарубежные страны.

Издатель

ООО «Наука и образование».
Адрес: 101000, Москва, Подсосенский пер., 28, стр. 1

Типография

ООО «ПРИНТ-М».
Адрес: 101000, Москва, Подсосенский пер., 28, стр. 1, офис 18

Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023.
Том 22, №3. Дата выхода 14.09.2023
Тираж 3000 экз. Цена свободная.

ВОПРОСЫ ГЕМАТОЛОГИИ/ОНКОЛОГИИ И ИММУНОПАТОЛОГИИ В ПЕДИАТРИИ

Научно-практический журнал

№ 3 | том 22 | 2023



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

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

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, Сиэтл, США

Родригес-Галиндо К.
профессор, Мемфис, США

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

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

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

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

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

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

Хармс Д.
профессор, Киль, Германия

Хенце Г.
профессор, Берлин, Германия

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



Editor-in-Chief

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

Deputy Editors-in-Chief

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

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

Executive Secretary

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

Members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mylen 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

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

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

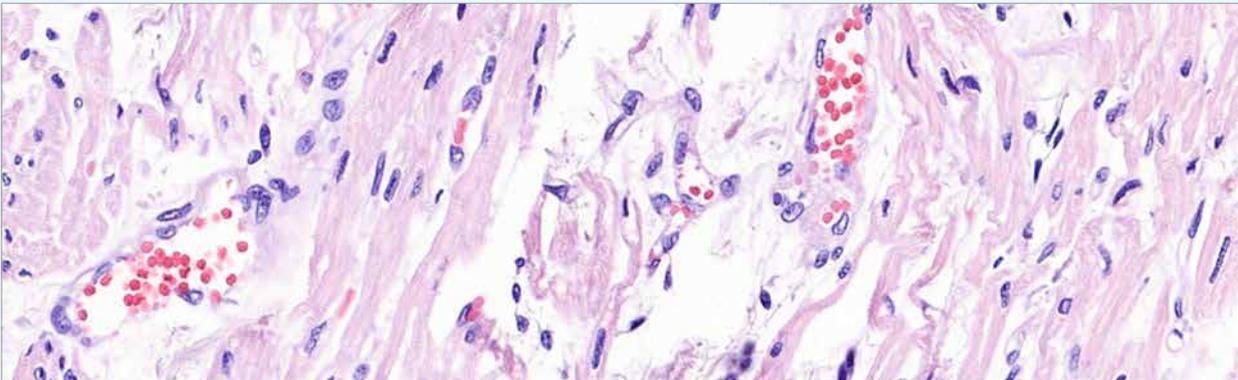
Henze G.
Professor, Berlin, Germany

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

Содержание

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 2023, 22 (3)

Оформление обложки:



*Миокард пациента с острым лимфобластным лейкозом и COVID-19. Периваскулярный отек и диапедезные кровоизлияния. Нарушение архитектоники. Окраска гематоксилином и эозином, × 40.
Из статьи Г.В. Кондратьева и соавт., с. 166*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- | | |
|---|----|
| <p>Результаты применения венетоклакса, даратумумаба и плериксафора в составе кондиционирования при химиорефрактерных формах острых лейкозов у детей
М.А. Климентова, Л.Н. Шелихова, М.А. Илюшина, С.Л. Благов, М.Е. Перминова, А.М. Попов, С.А. Кашпор, М.С. Фадеева, Ю.В. Ольшанская, С.Ю. Глушкова, Д.Е. Першин, Д.Н. Балашов, А.А. Масчан, М.А. Масчан</p> | 14 |
| <p>Успех повторной аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток со сменой донора при потере гетерозиготности HLA у пациента с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом: анализ серии клинических случаев
Л.А. Цветкова, А.А. Осипова, А.В. Евдокимов, П.В. Кожокар, Ж.З. Рахманова, И.М. Бархатов, О.В. Паина, О.С. Епифановская, Е.В. Бабенко, Н.Е. Иванова, Д.В. Козлов, Т.Л. Гиндина, Т.А. Быкова, Е.В. Семенова, Л.С. Зубаровская</p> | 28 |
| <p>Профилактика ингибиторной формы тяжелой гемофилии А у детей в Республике Беларусь: 12-летний опыт работы
Е.В. Дмитриев, Л.И. Волкова, О.В. Алейникова, А.В. Любушкин</p> | 36 |
| <p>Опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных тромбоцитопатий
Е.В. Юшкова, Н.А. Подоплелова, Д.В. Федорова, А.Л. Хорева, А.Ю. Щербина, П.А. Жарков, М.А. Пантелеев</p> | 43 |

- Молекулярно-генетическая диагностика в группе пациентов с гемофилией А в Республике Беларусь: 12 новых аллельных вариантов в гене *F8*** 48
А.В. Любушкин, И.Е. Гурьянова, Е.В. Дмитриев, В.Р. Вертелко, Е.А. Полякова, Л.И. Волкова, О.В. Алейникова
- Факторы риска появления патологических ингибиторов свертывания у детей с тяжелой гемофилией А** 58
Е.В. Дмитриев, А.В. Любушкин
- The impact of interferon-gamma level on the health status of patients with sickle cell disease in Basrah** 65
W.N. Ibraheim, H.A. Jasim, A.S. Abdullah
- Helicobacter pylori* infection in children with immune thrombocytopenia** 68
Seham M. Ragab, Mahmoud A. El-Hawy, Samah M. Awad, Walea Alaa Soliman, Asmaa A. Mahmoud
- Association between the levels of serum vitamin D and trace elements and joint health in children with hemophilia** 74
Seham M. Ragab, Alzahraa E.A. Sharaf, Noha R.M. Bayomy, Beshoy S.T. Abdel Nour, Asmaa A. Mahmoud
- Количественная магнитно-резонансная томография костного мозга у пациентов с острым лимфобластным лейкозом** 80
Г.В. Терещенко, Н.А. Кривенцова, Д.А. Куприянов, М.И. Абу Джабал, А.Д. Копанева, Н.В. Мякова, Д.В. Литвинов, А.И. Карачунский, Г.А. Новичкова
- Возможность использования гематологического показателя фракции незрелых тромбоцитов при назначении трансфузий тромбоцитарной массы** 88
М.И. Маркелов, С.А. Плясунова
- Опыт применения велаглуцеразы альфа у детей с болезнью Гоше 1-го типа в России** 94
Г.Б. Мовсисян, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Н.Н. Мазанова, Д.В. Хазыкова, А.И. Фирумьянц, А.С. Потапов, А.П. Фисенко

**Эффективность применения TRK-ингибитора
энтректиниба у пациентов с экстракраниальными
NTRK-перестроенными опухолями** 104

Т.В. Страдомская, А.М. Сулейманова, Д.М. Коновалов, А.Е. Друй, А.В. Панферова,
Е.В. Преображенская, Н.А. Андреева, Г.Б. Сагоян, М.В. Телешова, Л.А. Смирнова,
О.С. Зацаринная, Т.В. Шаманская, Н.С. Грачев, М.В. Рубанская, К.И. Киргизов,
Е.Н. Имянитов, С.Р. Варфоломеева, Д.Ю. Качанов

**Опыт использования аналога соматостатина
и иммуносупрессивной терапии в лечении
сложных форм хилоперитонеума и хилоторакса
у новорожденных и детей грудного возраста** 121

А.С. Гурская, М.А. Сулавко, Р.Р. Баязитов, И.В. Карнута, Е.В. Екимовская, О.Н. Наковкин,
Д.М. Ахмедова, А.А. Клепикова, Р.А. Хагуров, Н.В. Петрова, В.А. Скворцова

**Assessment of erythroferrone levels in children
with chronic kidney disease on regular hemodialysis** 130

Mahmoud Ahmed El-Hawy, Ahmed Adel Mahmoud Nowir, Shimaa Abdelsatar Refat Zaki,
Mohamed Shokry El-Haruon

**Диагностическая значимость сывороточного
эритропоэтина как маркера перинатального
поражения головного мозга у недоношенных
новорожденных с очень низкой массой тела
при рождении** 136

Д.Р. Шарафутдинова, Е.Н. Балашова, Ю.В. Кесслер, И.А. Ведихина, Ю.В. Сухова,
А.Р. Киртбая, А.Ю. Рындин, Т.Ю. Иванец, О.В. Ионов

**Содержание гемоглобина в ретикулоцитах как маркер
дефицита железа у недоношенных новорожденных
с очень низкой массой тела при рождении.
Простые методы диагностики дефицита железа** 146

Д.Р. Шарафутдинова, Е.Н. Балашова, Ю.В. Кесслер, Ю.В. Сухова, А.Р. Киртбая,
А.Ю. Рындин, Т.Ю. Иванец, О.В. Ионов

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

**Возрастные изменения характера нарушений
функции тромбоцитов у пациентки
с SLFN14-связанной макротромбоцитопенией** 156

Е.Ю. Рашевская, Д.М. Полохов, Д.В. Федорова, А.А. Игнатова, Е.А. Пономаренко,
Е.В. Райкина, И.В. Мерсиянова, А.В. Полетаев, Е.В. Трухина, С.А. Плясунова,
П.А. Жарков, М.А. Пантелеев

**Антрациклин-индуцированная кардиотоксичность
у ребенка с острым лимфобластным лейкозом
на фоне новой коронавирусной инфекции** 166

Г.В. Кондратьев, М.Е. Мельников, С.А. Кулева, А.С. Чепелев, С.Л. Баннова,
Т.Л. Корнишина, И.А. Решетняк, К.Д. Мурашева

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Использование технологий секвенирования
следующего поколения в диагностике врожденных
ошибок иммунной системы** 177

Е.А. Полякова, И.Е. Гурьянова, В.Р. Вертелко, А.В. Любушкин, Е.Я. Скопонец,
С.Н. Алешкевич, Ю.С. Жаранкова, С.О. Шарапова, М.В. Белевцев

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Синдром Швахмана–Даймонда: взгляд гематолога 185

И.П. Тесаков, Е.А. Деордиева, Т.Г. Бронтвейн, А.Н. Свешникова

**Эффективность и токсичность лекарственных
препаратов L-аспарагиназы в лечении острого
лимфобластного лейкоза у детей** 192

Д.С. Смирнова, Т.Т. Валиев

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

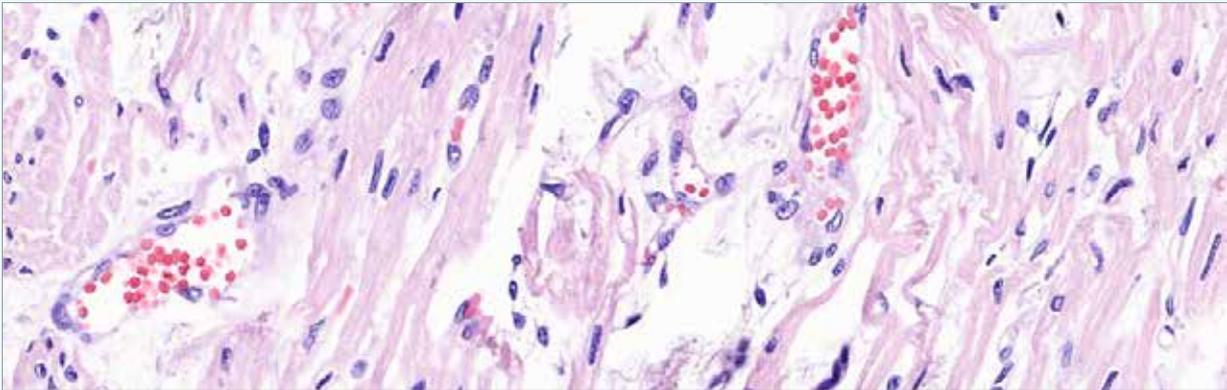
**Определение минимальной остаточной болезни
при В-линейном остром лимфобластном лейкозе
методом проточной цитометрии. Рекомендации
российско-белорусской кооперативной группы
по диагностике острых лейкозов у детей** 199

А.М. Попов, Е.В. Михайлова, Т.Ю. Вержбицкая, Л.В. Мовчан, Ж.В. Пермикин, Т.В. Шман,
А.И. Карачунский, Г.А. Новичкова

Content

© 2023 «D. Rogachev NMRCPhO», 2023, 22 (3)

Cover design:



The myocardium of a patient with acute lymphoblastic leukemia and COVID-19. Perivascular edema and diapedetic bleeding. Abnormal architecture. Hematoxylin & eosin staining, × 40.

From the article by G.V. Kondratiev et al., p. 166

ORIGINAL ARTICLE

- | | |
|--|----|
| <p>The results of therapy with venetoclax, daratumumab and plerixafor as part of the conditioning regimen in chemotherapy-refractory acute leukemia in children
 M.A. Klimentova, L.N. Shelikhova, M.A. Ilushina, S.L. Blagov, M.E. Perminova, A.M. Popov, S.A. Kashpor, M.S. Fadeeva, Yu.V. Olshanskaya, S.Yu. Glushkova, D.E. Pershin, D.N. Balashov, A.A. Maschan, M.A. Maschan</p> | 14 |
| <p>A successful second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor in a patient with loss of HLA heterozygosity relapse of juvenile myelomonocytic leukemia: case series analysis
 L.A. Tsvetkova, A.A. Osipova, A.V. Evdokimov, P.V. Kozhokar, Zh.Z. Rakhmanova, I.M. Barkhatov, O.V. Paina, O.S. Epifanovskaya, E.V. Babenko, N.E. Ivanova, D.V. Kozlov, T.L. Gindina, T.A. Bykova, E.V. Semenova, L.S. Zubarovskaya</p> | 28 |
| <p>The prophylaxis of severe hemophilia A with inhibitors in children in the Republic of Belarus: a 12-year experience
 E.V. Dmitriev, L.I. Volkova, O.V. Aleinikova, A.V. Liubushkin</p> | 36 |
| <p>A single-center experience of using immunofluorescence staining of blood smears for the diagnosis of hereditary thrombocytopathies
 E.V. Yushkova, N.A. Podoplelova, D.V. Fedorova, A.L. Khoreva, A.Yu. Shcherbina, P.A. Zharkov, M.A. Panteleev</p> | 43 |
| <p>Molecular genetic diagnosis in the group of hemophilia A patients in Belarus: 12 new allelic variants in the F8 gene
 A.V. Liubushkin, I.E. Guryanova, E.V. Dmitriev, V.R. Vertelko, E.A. Polyakova, L.I. Volkova, O.V. Aleinikova</p> | 48 |
| <p>Risk factors for coagulation inhibitor development in children with severe hemophilia A
 E.V. Dmitriev, A.V. Liubushkin</p> | 58 |

- The impact of interferon-gamma level on the health status of patients with sickle cell disease in Basrah** 65
W.N. Ibraheim, H.A. Jasim, A.S. Abdullah
- Helicobacter pylori* infection in children with immune thrombocytopenia** 68
Seham M. Ragab, Mahmoud A. El-Hawy, Samah M. Awad, Walaa Alaa Soliman, Asmaa A. Mahmoud
- Association between the levels of serum vitamin D and trace elements and joint health in children with hemophilia** 74
Seham M. Ragab, Alzahraa E.A. Sharaf, Noha R.M. Bayomy, Beshoy S.T. Abdel Nour, Asmaa A. Mahmoud
- Quantitative bone marrow magnetic resonance imaging in children with lymphoblastic leukaemia** 80
G.V. Tereshchenko, N.A. Kriventsova, D.A. Kupriyanov, M.I. Abu Jabal, A.D. Kopaneva, N.V. Myakova, D.V. Litvinov, A.I. Karachunskiy, G.A. Novichkova
- Using immature platelet fraction as a factor in deciding on the need for platelet transfusions** 88
M.I. Markelov, S.A. Plyasunova
- Velaglucerase alfa for treatment in children with Gaucher disease type 1: the Russian experience** 94
G.B. Movsisyan, K.V. Savost'yanov, A.A. Pushkov, N.N. Mazanova, J.V. Khazykova, A.I. Firumyants, A.S. Potapov, A.P. Fisenko
- The efficacy of the TRK inhibitor entrectinib in patients with extracranial *NTRK* fusion-positive tumors** 104
T.V. Stradomsкая, A.M. Suleymanova, D.M. Konovalov, A.E. Druy, A.V. Panfyorova, E.V. Preobrazhenskaya, N.A. Andreeva, G.B. Sagoyan, M.V. Teleshova, L.A. Smirnova, O.S. Zacarinnyaya, T.V. Shamanskaya, N.S. Grachev, M.V. Rubanskaya, K.I. Kirgizov, E.N. Imyanitov, S.R. Varfolomeeva, D.Yu. Kachanov
- A somatostatin analogue and immunosuppressive therapy in the treatment of complex forms of chyloperitoneum and chylothorax in newborns and infants** 121
A.S. Gurskaya, M.A. Sulavko, R.R. Bayazitov, I.V. Karnuta, E.V. Ekimovskaya, O.N. Nakovkin, D.M. Akhmedova, A.A. Klepikova, R.A. Khagurov, N.V. Petrova, V.A. Skvortsova
- Assessment of erythroferrone levels in children with chronic kidney disease on regular hemodialysis** 130
Mahmoud Ahmed El-Hawy, Ahmed Adel Mahmoud Nowir, Shima Abdelsatar Refat Zaki, Mohamed Shokry El-Haruon
- Diagnostic significance of serum erythropoietin as a marker of perinatal brain damage in premature newborns with very low birth weight** 136
D.R. Sharafutdinova, E.N. Balashova, Yu.V. Kessler, I.A. Vedikhina, Yu.V. Sukhova, A.R. Kirtbaya, A.Yu. Ryndin, T.Yu. Ivanets, O.V. Ionov
- Reticulocyte hemoglobin content as a marker of iron deficiency in premature newborns with very low birth weight. A simple tool for diagnosing iron deficiency** 146
D.R. Sharafutdinova, E.N. Balashova, Yu.V. Kessler, Yu.V. Sukhova, A.R. Kirtbaya, A.Yu. Ryndin, T.Yu. Ivanets, O.V. Ionov

CLINICAL OBSERVATION

- Age-dependent changes in platelet function of a patient with *SLFN14*-related macrothrombocytopenia** 156
E.Yu. Rashevskaya, D.M. Polokhov, D.V. Fyodorova, A.A. Ignatova, E.A. Ponomarenko, E.V. Raykina, I.V. Mersiyanova, A.V. Poletayev, E.V. Trukhina, S.A. Plyasunova, P.A. Zharkov, M.A. Pantelev

- Anthracycline-induced cardiotoxicity in a child with acute lymphoblastic leukaemia against the background of new coronavirus infection** 166
 G.V. Kondratiev, M.E. Melnikov, S.A. Kulyova, A.S. Chepelev, S.L. Bannova, T.L. Kornishina, I.A. Reshetnyak, K.D. Murasheva

CLINICAL SIGNIFICANCE OF BASIC RESEARCH

- The use of next generation sequencing technologies for the diagnosis of inborn errors of immunity** 177
 E.A. Polyakova, I.E. Guryanova, V.R. Vertelko, A.V. Liubushkin, K.Ya. Skapavets, S.N. Aleshkevich, Yu.S. Zharankova, S.O. Sharapova, M.V. Belevtsev

LITERATURE REVIEW

- Shwachman–Diamond syndrome: a hematologist's view** 185
 I.P. Tesakov, E.A. Deordieva, T.G. Brontveytn, A.N. Sveshnikova
- The efficacy and toxicity of L-asparaginase in the treatment of acute lymphoblastic leukemia in children** 192
 D.S. Smirnova, T.T. Valiev

DIAGNOSTIC GUIDELINES

- Minimal residual disease monitoring in B-lineage acute lymphoblastic leukemia using flow cytometry. Guidelines of the Russian-Belarusian multicenter group for pediatric acute leukemia studies** 199
 A.M. Popov, E.V. Mikhailova, T.Yu. Verzhbitskaya, L.V. Movchan, Zh.V. Permikin, T.V. Shman, A.I. Karachunskiy, G.A. Novichkova

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 06.06.2023
Принята к печати 27.06.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-14-27

Результаты применения венетоклакса, даратумумаба и плериксафора в составе кондиционирования при химиорефрактерных формах острых лейкозов у детей

М.А. Климентова, Л.Н. Шелихова, М.А. Илюшина, С.Л. Благов, М.Е. Перминова, А.М. Попов, С.А. Кашпор, М.С. Фадеева, Ю.В. Ольшанская, С.Ю. Глушкова, Д.Е. Першин, Д.Н. Балашов, А.А. Масчан, М.А. Масчан

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

Контактная информация:

Масчан Михаил Александрович,
д-р мед. наук, профессор,
заместитель генерального
директора – директор Института
молекулярной и экспериментальной
медицины ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mmaschan@yandex.ru

Основные исходы аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) при химиорефрактерных формах острых лейкозов остаются неудовлетворительными в первую очередь за счет высоких рисков рецидива. Добавление в режимы кондиционирования комбинаций таргетных препаратов является потенциальным подходом к повышению антилейкемической активности ТГСК. Мы оценивали безопасность и потенциальную эффективность добавления комбинации венетоклакса, даратумумаба и плериксафора в схемы кондиционирования у детей с химиорефрактерными формами острых лейкозов, получивших аллогенную ТГСК на платформе TCR $\alpha\beta$ /CD19-деплеции, на основании данных пилотного исследования, а также изучения ретроспективной когорты пациентов, прошедших аналогичную терапию по индивидуальным показаниям. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Все 43 оцениваемых пациента (33 с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), 8 с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ) и 2 с острым лейкозом неопределенной линейности) на момент проведения аллогенной ТГСК имели статус активного заболевания. В основе миелоаблативного режима кондиционирования применялись тотальное облучение тела или треосульфан, или мелфалан. В качестве источника трансплантата для 38 пациентов использован гаплоидентичный донор, для 5 – полностью совместимый родственник или неродственный донор. Приживление трансплантата зафиксировано в 93% случаев, избыточной токсичности отмечено не было. МОБ (минимальная остаточная болезнь)-негативная ремиссия зафиксирована у 37 (86%) пациентов. Кумулятивный риск развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) II–IV стадии составил 10%, хронической РТПХ – 5%. В течение 2 лет трансплантат-ассоциированная смертность составила 7%, риск развития рецидива – 52%, бессобытийная и общая выживаемость – 41% и 51% соответственно. Уровень общей выживаемости для подгруппы пациентов с ОМЛ составил 58%, для Т-ОЛЛ – 25%. Наши данные показывают, что добавление таргетных агентов в состав кондиционирования безопасно, однако не приводит к улучшению результатов ТГСК в изучаемой когорте пациентов.

Ключевые слова: TCR $\alpha\beta$ /CD19-деплеция, химиорефрактерные формы острых лейкозов, венетоклакс, даратумумаб, плериксафор

Климентова М.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 14–27. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-14-27

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 06.06.2023
Accepted 27.06.2023

The results of therapy with venetoclax, daratumumab and plerixafor as part of the conditioning regimen in chemotherapy-refractory acute leukemia in children

M.A. Klimentova, L.N. Shelikhova, M.A. Ilushina, S.L. Blagov, M.E. Perminova, A.M. Popov, S.A. Kashpor, M.S. Fadeeva, Yu.V. Olshanskaya, S.Yu. Glushkova, D.E. Pershin, D.N. Balashov, A.A. Maschan, M.A. Maschan

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

The main outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in chemotherapy-refractory acute leukemia remain suboptimal due to a high relapse rate. The incorporation of targeted anti-leukemia agents into the conditioning regimens is a potential approach to improve the efficacy of HSCT. We assessed the safety and potential efficacy of the addition of venetoclax, daratumumab, and plerixafor to the conditioning regimens in children with chemotherapy-refractory acute leukemias who received allogeneic TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted HSCT. We used data from a pilot study, as well as the data of patients from a retrospective cohort who received similar therapy according to the individual indications. 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. All 43 patients (33 acute myeloid leukemias (AML), 8 T-cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL) and 2 acute leukemias of ambiguous lineage) had active disease status at the time of transplantation. The preparative regimen included myeloablative conditioning based on either total body irradiation or treosulfan or melphalan. A haploidentical related donor was used as a graft source in 38 cases, while a fully matched related or unrelated donor was used

Correspondence:

Michael A. Maschan,
Dr. Med. Sci., Professor, Deputy Director
General, Director of the Institute of Molecular
and Experimental Medicine of the Dmitry
Rogachev National Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology and
Immunology of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: mmaschan@yandex.ru

in 5 cases. The engraftment was observed in 93% of cases, no excessive toxicity was noted. MRD-negative complete remission was achieved in 37 patients (86%). The cumulative incidence of grade II–IV acute graft-versus-host disease (GvHD) was 10%, and the cumulative incidence of chronic GvHD was 5%. At 2 years, transplant-related mortality was 7%, relapse incidence was 52%, event-free survival was 41%, and overall survival was 51%. The overall survival rate for the AML group was 58% and 25% for the T-ALL group. Our data show that the addition of targeted agents to the conditioning regimens is safe, however, does not significantly improve the results of HSCT in the study cohort of patients.

Key words: TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletion, chemotherapy-refractory acute leukemia, venetoclax, daratumumab, plerixafor

Klimentova M.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 14–27.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-14-27

Химиорезистентные формы острых лейкозов (ОЛ) являются сложной задачей для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Успехи в улучшении качества сопроводительной терапии, обработке трансплантата и профилактике реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) значительно снизили уровень трансплантат-ассоциированной смертности (ТС), однако среди детей с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), трансплантированных вне ремиссии, риски рецидива сохраняются на уровне 30–60% [1]. Результаты ТГСК пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) вне ремиссии крайне неудовлетворительны и ее применение в данном случае не рекомендовано [2, 3]. Важно отметить, что использование высокодозной химиотерапии и тотального облучения тела (ТОТ) остается важной составляющей ТГСК, несмотря на значительный прогресс в изучении патогенеза лейкоза и разработку большого количества таргетных препаратов. При проведении ТГСК на платформе селективной деплеции у детей с рефрактерными формами ОМЛ нами продемонстрирован уровень бессобытийной выживаемости (БСВ) около 50% [4]. В дополнение к данному подходу было предложено добавление комбинации таргетных препаратов на основе оценки экспрессии потенциальных мишеней. BCL-2, CD38 и CD184 были выбраны в качестве потенциальных мишеней на основе данных о высокой экспрессии данных молекул при ОЛ у детей [3, 5–10], а применение венетоклакса, даратумумаба и плериксафора основывалось на доклинических данных об эффективности, результатах ранних фаз клинических исследований, а также ожиданием неперекрывающегося профиле токсичности данных препаратов с препаратами, используемыми в режимах кондиционирования [11–19]. С учетом появления новых многообещающих терапевтических опций для В-линейного ОЛЛ (В-ОЛЛ) (моноклональные антитела, CAR-T-терапия) было принято решение сфокусироваться на группах пациентов с химиорезистентными формами ОМЛ и Т-линейного ОЛЛ (Т-ОЛЛ).

Настоящая статья представляет собой обобщение результатов пилотного исследования и когорты пациентов, получивших аналогичную терапию по индивидуальным показаниям на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гема-

тологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В период с ноября 2017 г. по март 2020 г. 43 пациентам с химиорезистентной формой ОЛ проведена аллогенная ТГСК на платформе TCR $\alpha\beta$ /CD19-деплеции, предшествующие режимы кондиционирования включали один из таргетных препаратов или их комбинации. Двенадцать пациентов были включены в проспективное клиническое исследование NCT04000698 «Пилотное исследование I–II фазы эффективности и безопасности персонализированной таргетной терапии в комбинации с T-деплезированной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток при лечении детей и молодых взрослых с химиорезистентным острым лейкозом», проводившееся в нашем Центре. Тридцать один пациент получил аналогичную терапию по индивидуальным показаниям. Характеристика пациентов представлена в *таблице 1*.

Пятнадцать девочек и 28 мальчиков с медианой возраста 11,2 (1–21) года получили аллогенную ТГСК. ОМЛ был диагностирован у 33 пациентов, Т-ОЛЛ – у 8 и у 2 – лейкоз неопределенной линейности (острый недифференцированный лейкоз и острый бифенотипический лейкоз (Т-ОЛЛ + ОМЛ)). Согласно классификации на группы риска на основе исходной цитогенетики среди пациентов с ОМЛ [20] 1 принадлежал к стандартной группе риска, 15 – к промежуточной, 17 – к высокой группе риска. Среди пациентов с Т-ОЛЛ у 1 была выявлена t(8;14), у 1 – реаранжировка гена *TLX3*, в остальных случаях генетических событий обнаружено не было. Генетические варианты заболеваний представлены в *таблице 2*.

Все пациенты на момент ТГСК имели статус активного заболевания: > 5% бластных клеток в костном мозге при морфологическом исследовании, МОБ, детектированная методом проточной цитометрии или цитогенетическими методами и/или экстрамедуллярные очаги. Первично-рефрактерное течение зафиксировано у 14 пациентов, рефрактерный

Таблица 1
Характеристика пациентов

Table 1
Patient characteristics

Параметр Parameter	Значение Value
Число пациентов, <i>n</i> The number of patients, <i>n</i>	20
Возраст, медиана (диапазон), годы Age, median (range), years	11,55 (3–16)
Пол, мальчики/девочки, <i>n</i> (%) Gender, boys/girls, <i>n</i> (%)	13/7 (65/35)
Стадия заболевания, <i>n</i> (%): Stage of the disease, <i>n</i> (%):	
первично-рефрактерное течение primary refractory disease	14 (32,6)
рефрактерный рецидив refractory relapse	29 (67,4)
после ТГСК after HSCT	12
Опухолевая нагрузка, <i>n</i> (%) Tumor burden, <i>n</i> (%)	
большая (бласты в костном мозге) high (blasts in the bone marrow)	29 (67,4)
малая (МОБ) low (minimal residual disease)	14 (32,6)
Циторедуктивная профазы в кондиционировании, <i>n</i> (%) Cytoreductive profase during the conditioning regimen, <i>n</i> (%)	14 (33)
Основа кондиционирования, <i>n</i> (%): The basis of conditioning, <i>n</i> (%):	
ТОТ total body irradiation	19 (44,1)
треосульфат treosulfan	22 (51,2)
мелфалан melphalan	2 (4,7)
Применяемые таргетные препараты, <i>n</i> (%): Targeted drugs used, <i>n</i> (%):	
венетоклакс venetoclax	8 (18,6)
даратумумаб daratumumab	3 (7)
венетоклакс + даратумумаб venetoclax + daratumumab	15 (34,9)
даратумумаб + плериксафор daratumumab + plerixafor	1 (2,2)
венетоклакс + плериксафор venetoclax + plerixafor	2 (4,7)
венетоклакс + даратумумаб + плериксафор venetoclax + daratumumab + plerixafor	14 (32,6)
№ ТГСК, <i>n</i> (%): HSCT №, <i>n</i> (%):	
1	31 (72,1)
2	12 (27,9)
Донор, <i>n</i> (%): Donor, <i>n</i> (%):	
гаплоидентичный haploidentical	38 (88,4)
10/10 совместимый родственник 10/10 matched related	2 (4,7)
10/10 совместимый неродственный 10/10 matched unrelated	3 (6,9)
Трансплантат, медиана, × 10 ⁶ /кг: Graft, median, × 10 ⁶ /kg:	
CD34 ⁺ -клетки CD34 ⁺ cells	9,42
α/β-T-лимфоциты α/β T lymphocytes	20,65
B-лимфоциты B lymphocytes	0,67
NK-клетки NK cells	35,16
ИДЛ после ТГСК, <i>n</i> (%): DLI after HSCT, <i>n</i> (%):	
без ИДЛ no DLI	2 (4,7)
клетки памяти memory cells	41 (95,3)

Примечание. МОБ – минимальная остаточная болезнь; ИДЛ – инфузия донорских лимфоцитов.

Note. HSCT – hematopoietic stem cell transplantation; DLI – donor lymphocyte infusion.

Таблица 2
Генетические варианты заболеваний

Table 2
Genetic variants of the diseases

Генетический вариант Genetic variant	<i>n</i>
Моносомия 7 Monosomy 7	2
t(8;9)	1
t(8;21)	1
t(9;11)	2
<i>NUP98</i>	1
Гиперэкспрессия <i>WT1</i> <i>WT1</i> overexpression	1
Мутация <i>PTPN11</i> <i>PTPN11</i> mutation	1
Комплексный кариотип Complex karyotype	2
Отсутствие аномалий No anomalies	9

рецидив – у 29 (у 12 из них после аллогенной ТГСК). Двадцать шесть пациентов имели большой объем опухолевой нагрузки (бласты в костном мозге или экстрамедуллярные очаги), 7 – малый объем опухоли (детектируемая МОБ).

Пациенты с первично-рефрактерными формами и рефрактерными рецидивами ОМЛ до ТГСК получили по 2 курса высокодозной химиотерапии, включающих флударабин, цитарабин +/- антрациклины. При первично-рефрактерных формах Т-ОЛЛ применяли терапию для пациентов высокого риска, включающую 3–5 курсов химиотерапии, при рецидивах – 2–3 курса высокодозной химиотерапии. Пациенты с ОЛ неопределенной линейности получали 2–3 курса полихимиотерапии с варьирующимися комбинациями препаратов.

Всем пациентам выполнено миелоаблативное кондиционирование. В 14 случаях проведен циторедуктивный курс химиотерапии, включающий флударабин 30 мг/м²/сут и цитарабин 2000 мг/м²/сут с 1-х по 5-е сутки с последующей инициацией основного этапа кондиционирования через 4–8 дней от окончания циторедуктивной профазы, по схеме, опубликованной нами ранее [7]. Кондиционирование на основе ТОТ использовано в 19 случаях, треосульфата – в 22, мелфалана – в 2, в качестве второго алкилирующего агента применяли этопозид, мелфалан или тиотепу. У всех пациентов в состав кондиционирования были включены таргетные препараты, их комбинации формировались на основании наличия на опухолевых клетках рецепторов для определенного терапевтического агента, а также доступности препарата в клинике (комбинации представлены в таблице 1). Таргетные препараты использовались в стандартных дозах. Даратумумаб (моноклональное антитело к антигену CD38) вводился однократно в дозе 16 мг/кг внутривенно (в/в) на –7-е сутки в 27 случаях и в циторедуктивную

профазу на –15-е сутки в 9 случаях. Селективный ингибитор белка BCL2 венетоклакс применялся в дозе 300 мг/м²/сут перорально с –6-х по –2-е сутки; пациентам, получавшим циторедуктивную профазу, данный препарат вводили с начала циторедуктивной профазы до –2-х суток. Селективный антагонист CXCR4 хемокинового рецептора (CD184) плериксафор вводился подкожно (п/к) в дозе 240 мкг/кг/сут с –6-х по –4-е сутки.

В качестве профилактики РТПХ нами использовались ингибитор IL-6 тоцилизумаб в дозе 8 мг/кг в/в на –1-е сутки, блокатор ко-стимуляции Т-лимфоцитов абатацепт в дозе 10 мг/кг в/в в дни –1, +7, +14, +28. В целях дополнительной деплеции В-лимфоцитов все пациенты получали ритуксимаб 200 мг/м² на –1-е сутки. Также для всех пациентов предполагалось использование бортезомиба в дозе 1,3 мг/м²/сут п/к в дни –5, –2, +2, +5; 23 человека получили как минимум 1 введение, для других пациентов данный препарат не использовался в связи с противопоказаниями (нарушение сердечной проводимости, тяжелая нейропатия, тяжелый инфекционный процесс с проявлениями гемодинамической нестабильности).

В качестве источника трансплантата для всех пациентов были использованы периферические стволовые клетки крови, полученные путем афереза после стимуляции гранулоцитарным колониестимулирующим фактором. Деплеция αβ-Т- и В-лимфоцитов проводилась с использованием ClinMACS Plus or ClinMACS Prodigy (Miltenyi Biotec, Германия).

Для 31 пациента трансплантация была первой, для 12 – второй. Гаплоидентичный донор был использован в 38 случаях, полностью совместимый родственник донор – в 2, полностью совместимый неродственный донор – в 3. Медиана содержания в трансплантате CD34⁺-клеток – 9,4 × 10⁶/кг, αβ-Т-лим-

фоцитов – 20,6 × 10³/кг, В-лимфоцитов – 0,67 × 10⁶/кг, NK-клеток – 35,2 × 10⁶/кг.

Приживление нейтрофилов фиксировалось в первый из 3 последовательных дней с уровнем нейтрофилов выше 0,5 × 10⁹/л, приживление тромбоцитов – в первый из 3 последовательных дней с уровнем тромбоцитов выше 20 × 10⁹/л без предшествующих трансфузий.

Статус ремиссии оценивался на +30-е сутки от ТГСК; ремиссия устанавливалась при отсутствии детекции бластных клеток, МОБ и/или экстрамедуллярных очагов всеми методами, доступными для пациента.

Диагностика и стадирование острой и хронической РТПХ проводились в соответствии со стандартными критериями [21–23].

Сорок один пациент как минимум однократно (в том числе в день 0) получал инфузии донорских клеток памяти (продукт CD45RA-деплеции), полученных из продукта первичного афереза, по схеме, сообщаемой нами ранее [24, 25]. Один пациент не получал ИДЛ в связи с высоким содержанием αβ-Т-лимфоцитов в трансплантате, 1 – в связи с первичным неприживлением трансплантата. В 3 случаях отмечены проявления острой РТПХ непосредственно после ИДЛ.

В качестве группы сравнения для когорты пациентов с ОМЛ использовалась группа больных, получивших ТГСК на платформе TCRαβ/CD19-деплеции без добавления таргетных препаратов в состав кондиционирования [4]. Группа сравнения была сопоставима с оцениваемой в настоящем исследовании по размеру, возрастным характеристикам, режимам кондиционирования и профилактике РТПХ, источникам трансплантата (основные характеристики представлены в таблице 3).

Конечные точки включали кумулятивную вероятность рецидива/прогрессии (КВР/П), ТС, острую и

Таблица 3

Соотношение основных исходов между проспективной и ретроспективной группами

Table 3

A comparison of the main outcomes between the prospective and the retrospective group

Основной исход Main outcome	Общая выборка Overall population	Проспективная группа Prospective group	Ретроспективная группа Retrospective group	p
Острая РТПХ II–IV стадии, % Grade II–IV acute GvHD, %	10,3 (4,1–26,1)	8,3 (1,3–54,4)	11,1 (3,8–32,4)	0,850
Острая РТПХ III–IV стадии, % Grade III–IV acute GvHD, %	5,1 (1,3–19,6)	8,3 (1,3–54,4)	3,7 (0,5–25,3)	0,528
Хроническая РТПХ, % Chronic GvHD, %	4,8 (0,7–32,2)	0	5,9 (0,9–39,4)	0,628
КВР/П, % CPR/P, %	52,3 (39,4–69,6)	50,0 (28,4–88,0)	53,6 (37,9–75,6)	0,845
ТС, % TRM, %	7,0 (2,3–20,0)	0	9,7 (3,3–28,4)	0,270
БСВ, % EFS, %	40,7 (25,6–55,8)	50,0 (21,7–78,3)	38,7 (21,6–55,9)	0,616
ОВ, % OS, %	51,3 (35,9–66,8)	47,1 (14,4–79,9)	51,6 (34,0–69,2)	0,818

Note. GvHD – graft-versus-host disease; TRM – transplant-related mortality; CPR/P – cumulative probability of relapse/progression; EFS – event-free survival; OS – overall survival.

хроническую РТПХ, БСВ и общую выживаемость (ОВ). Событиями считались смерть от любой причины, рецидив или персистенция лейкоэмических бластов, которые учитывали при анализе БСВ. Иммуноконституция и риск развития РТПХ оценивались у пациентов с приживлением трансплантата. ТС и рецидив/прогрессирование считались конкурирующими рисками, их рассчитывали в соответствии с моделью конкурирующих рисков. БСВ и ОВ определяли с помощью метода Каплана–Майера. Для статистического анализа было использовано программное обеспечение XLSTAT (Addinsoft, Париж, Франция). Выжившие пациенты цензурированы датой последнего наблюдения (25.10.2020), медиана наблюдения для них составила 21 (6–35) мес.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ уровня экспрессии таргетных антигенов на опухолевых клетках

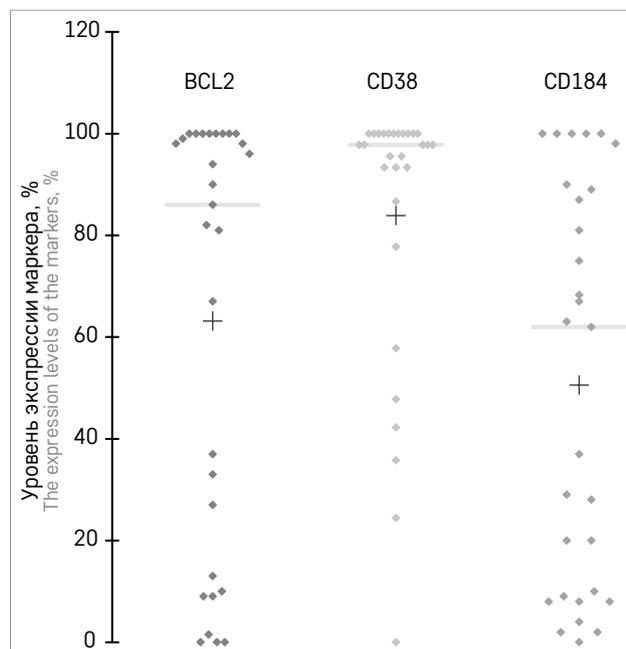
Мы оценили данные по экспрессии CD38, BCL-2 и CD184 на опухолевых клетках пациентов методом проточной цитометрии. По техническим причинам оценка уровней BCL2 и CD38 проведена для 39 пациентов, CD184 – для 32. Медиана уровня экспрессии маркера (доля опухолевых клеток, содержащих данный антиген): для BCL-2 – 91,0%, для CD38 – 100,0%, для CD184 – 29,3% (рисунки 1).

Рисунок 1

Уровень экспрессии исследуемых маркеров
Число исследованных пациентов для BCL-2 и CD38 – по 39, для CD184 – 32. Медиана экспрессии BCL-2 – 91,0%, CD38 – 100,0%, CD184 – 29,3%

Figure 1

The expression level of the markers of interest
The number of the studied patients for BCL-2 and CD38: 39 patients for each marker; 32 patients for CD184. The median expression of BCL-2, CD38 and CD184 is 91.0%, 100.0%, and 29.3%, respectively



При отдельном анализе уровней экспрессии маркеров для ОМЛ и Т-ОЛЛ обнаружен одинаково высокий показатель для CD38 (медиана 100,0% для ОМЛ и 99,0% для Т-ОЛЛ) и значительно различный для BCL-2 (медиана 96,5% для ОМЛ и 33,0% для Т-ОЛЛ, $p = 0,040$) и CD184 (медиана 20,0% для ОМЛ и 85,5% для Т-ОЛЛ, $p = 0,039$) (рисунки 2А–В).

Мы также определили долю пациентов, положительных по определенному маркеру. Основываясь на литературных данных [11, 12], положительными считали опухолевые клетки с экспрессией маркера более 20%. Доля пациентов с BCL-2-положительным ОЛ составила 80% для ОМЛ и 57,4% для Т-ОЛЛ; с CD38-положительным ОЛ – 96,5% для ОМЛ и 100,0% для Т-ОЛЛ; с CD184-положительным ОЛ – 48,0% для ОМЛ и 87,5% для Т-ОЛЛ (рисунки 2Г–Е).

Среди 37 пациентов, получавших венетоклакс, для 11 наряду с уровнем экспрессии BCL-2 доступны данные по экспрессии MCL-1 и BCL-xL. Для всех исследуемых больных опухолевая популяция характеризовалась высоким уровнем экспрессии антиапоптотических белков (медиана для MCL-1 100%, для BCL-xL 93%).

Нами планировалось использование таргетных препаратов, основываясь на уровне экспрессии маркеров на опухолевых клетках, однако измерить его у всех пациентов (особенно в ретроспективной группе) не представлялось возможным по техническим причинам, а возможность применения конкретного препарата была ограничена его доступностью в клинике в данный момент времени.

Токсичность

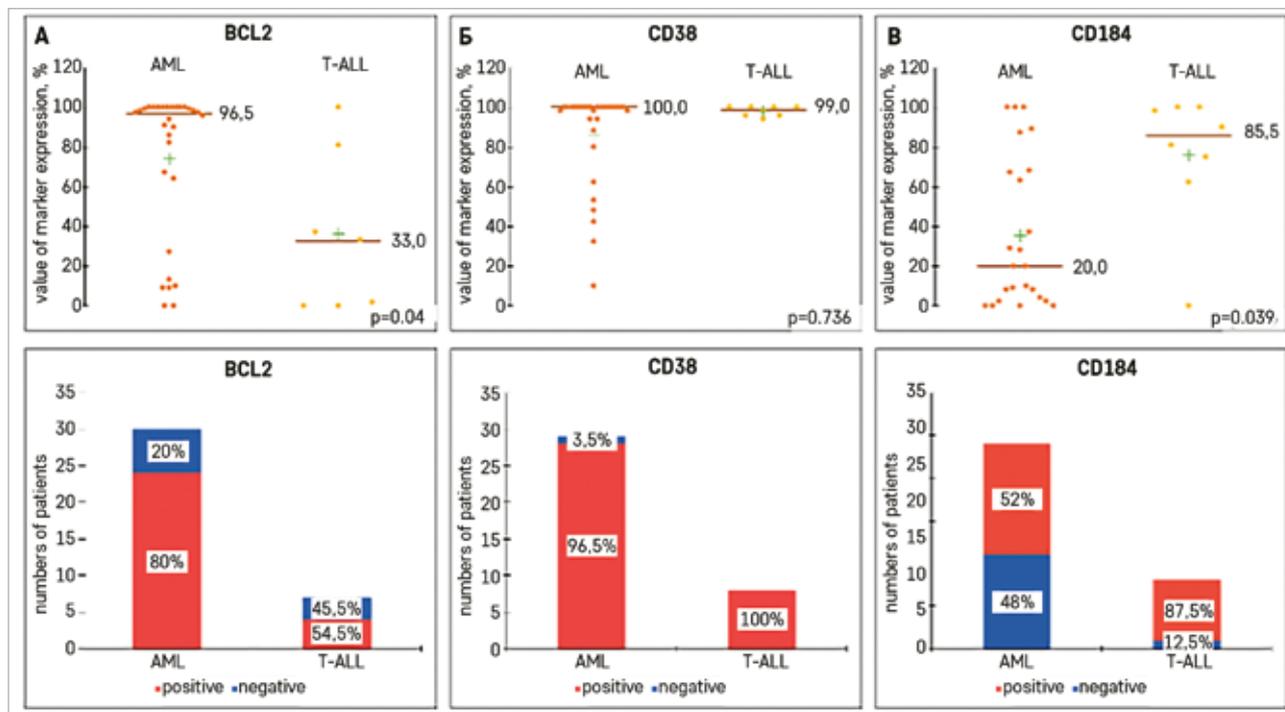
В данной когорте пациентов мы оценивали раннюю токсичность (до 28 дней после ТГСК). Чрезмерной токсичности кондиционирования с добавлением таргетных препаратов отмечено не было. Среди всех пациентов ($n = 43$) развитие мукозита III–IV степени было отмечено в 14 (32,5%) случаях, веноокклюзионной болезни – в 1 (2,3%), сердечно-сосудистой токсичности в виде гемодинамической нестабильности, связанной с сепсисом, – в 7 (16,3%), легочной токсичности (пневмония) – в 8 (18,6%), нейротоксичности (периферическая во всех случаях) – в 3 (6,9%). Пять (11,6%) пациентов были госпитализированы в отделение реанимации и интенсивной терапии. Вклад конкретного препарата в общие побочные эффекты миелоаблативного кондиционирования оценить затруднительно. Для даратумумаба инфузионные реакции оценивались отдельно, среди 33 пациентов, получавших препарат, они были зарегистрированы у 8 (24%). Тяжелые реакции (III степени) наблюдались у 3 (9,1%) пациентов (бронхоспазм, ангионевротический отек, нарушение остроты зрения), легкие/умеренные реакции

Рисунок 2

Соотношение экспрессии BCL-2 (А), CD38 (Б), CD184 (В) между ОМЛ и Т-ОЛЛ и процент позитивных случаев ОЛ по определенному маркеру (BCL-2 (Г), CD38 (Д), CD184 (Е)) среди ОМЛ и Т-ОЛЛ
Число оцениваемых пациентов для BCL-2: 30 с ОМЛ, 7 с Т-ОЛЛ; для CD38: 29 с ОМЛ, 8 с Т-ОЛЛ; для CD184: 24 с ОМЛ, 8 с Т-ОЛЛ

Figure 2

A comparison of BCL-2 (A), CD38 (Б), CD184 (B) expression in acute myeloid leukemia (AML) and T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and the percentage of patients with AML and T-ALL positive for BCL-2 (Г), CD38 (Д), and CD184 (Е)
The number of patients evaluated for: BCL-2 – 30 patients with AML and 7 patients with T-ALL; CD38 – 29 patients with AML and 8 patients with T-ALL; CD184 – 24 patients with AML and 8 patients with T-ALL



(I–II степени) – у 5 (15,2%) (артериальная гипертензия, головокружение, суставной синдром, крапивница), угрожающих жизни осложнений (IV степени) отмечено не было. Специфические реакции на введение плериксафора включали лихорадку у 2 (13,3%) из 15 пациентов и костные боли у 1 (6,6%).

Приживление трансплантата

Приживление трансплантата было зарегистрировано у 40 (93%) пациентов с медианой 12 дней для нейтрофилов и 14 дней для тромбоцитов. Два пациента умерли до приживления на +9-й и +13-й дни от инфекционных осложнений и в 1 случае зафиксировано первичное неприживление на фоне прогрессии лейкоза.

Реакция «трансплантат против хозяина»

Острая РТПХ II–IV стадии была диагностирована у 4 пациентов, кумулятивная частота развития составила 10,3% (95% доверительный интервал (ДИ) 4,1–26,1) (рисунок 3А). Острая РТПХ III–IV стадии была диагностирована у 2 пациентов, кумулятивная частота развития составила 5,1% (95% ДИ 1,3–19,6). У 14 пациентов были признаки острой РТПХ I стадии с изолированным поражением кожи; кумулятивная частота острой РТПХ I–IV стадии составила 48,4%

(95% ДИ 30,0–67,0). Хроническая РТПХ развилась у 1 пациента через 349 дней после ТГСК, кумулятивная частота возникновения составила 4,8% (95% ДИ 0,7–32,2) (рисунок 3Б).

Основные исходы

Три пациента умерли от причин, не связанных с основным заболеванием, на 9, 13 и 54-е сутки от ТГСК из-за полиорганной недостаточности на фоне септического шока. Кумулятивная частота ТС составила 7,0% (95% ДИ 2,3–20,0) (рисунок 4А).

Ремиссия была зафиксирована у 37 (86,3%) пациентов. Рецидив или прогрессия развились в 22 случаях с медианой 85 дней (диапазон от 21 до 361 дня). КВР/П в течение 2 лет составила 52,3% (95% ДИ 39,4–69,6), 2-летняя БСВ – 40,7% (95% ДИ 25,6–55,8), 2-летняя ОВ – 51,3% (95% ДИ 35,9–66,8). Основные исходы представлены на рисунке 4. Соотношение основных результатов в подгруппе проспективного исследования и ретроспективной подгруппе представлено в таблице 3.

Сравнение пациентов с ОМЛ в исследуемой когорте с историческим контролем (пациенты с ОМЛ вне ремиссии, получившие ТГСК на платформе селективной деплеции без включения таргетных препаратов в кондиционирование) не выявило стати-

Рисунок 3

Кумулятивная частота развития: А – острой РТПХ II–IV стадии (сплошная линия) с 95% ДИ (пунктирные линии); Б – хронической РТПХ (сплошная линия) с 95% ДИ (пунктирные линии)

Figure 3

Cumulative incidence of: A – grade II–IV acute GvHD (solid line) with the 95% confidence interval (CI) (dashed line); Б – chronic GvHD (solid line) with the 95% CI (dashed line)

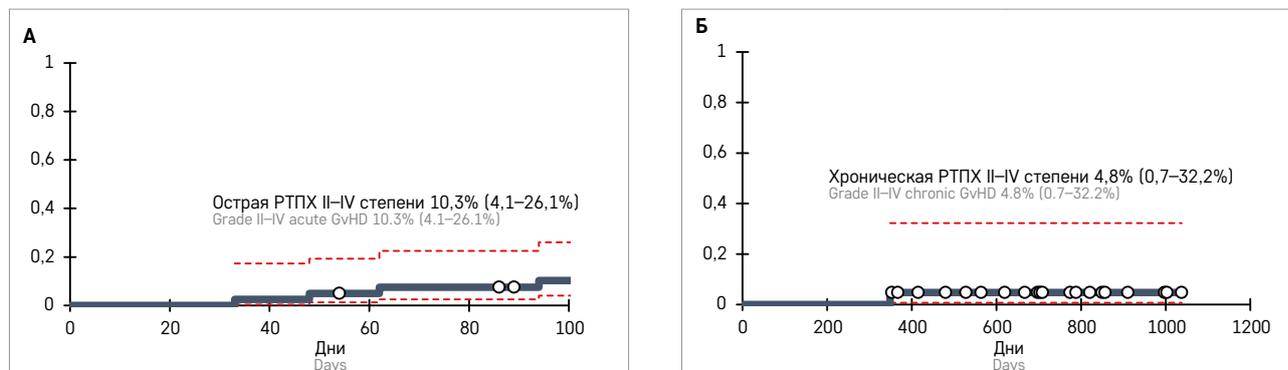


Рисунок 4

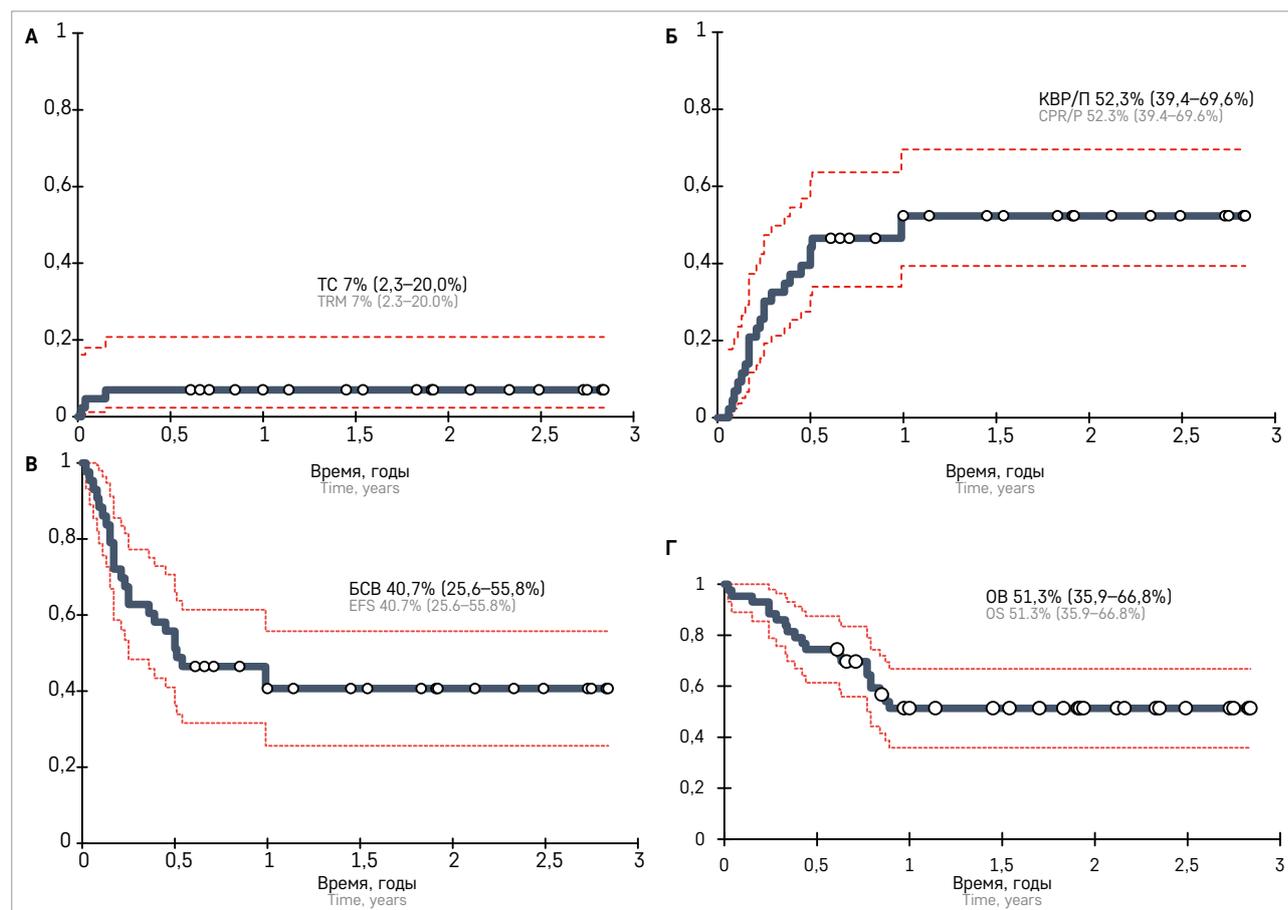
Основные исходы ТГСК

А – ТС (сплошная линия) с 95% ДИ (пунктирные линии); Б – КВР/П (сплошная линия) с 95% ДИ (пунктирные линии); В – БСВ (сплошная линия) с 95% ДИ (пунктирные линии); Г – ОВ (сплошная линия) с 95% ДИ (пунктирные линии)

Figure 4

The main outcomes of HSCT

А – TRM (solid line) with the 95% CI (dashed line); Б – CPR/P (solid line) with the 95% CI (dashed line); В – EFS (solid line) with the 95% CI (dashed line); Г – OS (solid line) with the 95% CI (dashed line)



стически значимых различий (основные характеристики и исходы представлены в таблице 4).

Факторы риска

Мы оценили влияние отдельных факторов на исход, включая подтип лейкоза, стадию заболевания,

номер ТГСК и др. В таблице 5 обобщены данные о влиянии факторов риска на основные исходы трансплантации. Наблюдалась тенденция к более высокой частоте рецидивов и более низкой ОВ для пациентов с Т-ОЛЛ в сравнении с ОМЛ (КВР/П для ОМЛ 50,3%, для Т-ОЛЛ 62,2%, $p = 0,300$). ОВ в группе ОМЛ соста-

Таблица 4

Характеристика группы пациентов с химиорефрактерными формами ОМЛ, получавших кондиционирование с добавлением таргентных препаратов и стандартное кондиционирование

Table 4

Characteristics of the group of the patients with chemotherapy-refractory AML who underwent conditioning with or without targeted drugs

Параметр Parameter	С включением таргентных препаратов With targeted drugs	Без включения таргентных препаратов Without targeted drugs
Основные характеристики The main characteristics		
Медиана наблюдения, годы Median follow-up time, years	0,85	1,24
Число пациентов, <i>n</i> The number of patients, <i>n</i>	33	29
Возраст, медиана, годы Median age, years	11,4	10,5
Пол, мальчики/девочки, <i>n</i> (%) Gender, boys/girls, <i>n</i> (%)	21/12 (64/36)	17/12 (59/41)
Стадия заболевания, <i>n</i> (%): Stage of the disease, <i>n</i> (%):		
первично-рефрактерное течение primary refractory disease	11 (33,3)	12 (41,3)
рефрактерный рецидив (после ТГСК) refractory relapse (after HSCT)	22 (66,7)	17 (58,7)
Опухолевая нагрузка, <i>n</i> (%) Tumor burden, <i>n</i> (%)		
большая (бласты в костном мозге) high (blast cells in the bone marrow)	26 (78,8)	20 (68,9)
малая (МОБ) low (minimal residual disease)	7 (21,2)	9 (31,1)
Основа кондиционирования, <i>n</i> (%): Conditioning, <i>n</i> (%):		
ТОТ total body irradiation	13 (39,3)	5 (17,2)
треосульфам treosulfan	18 (54,5)	23 (79,3)
мелфалан melphalan	2 (6,2)	1 (3,5)
№ ТГСК, <i>n</i> (%): HSCT №, <i>n</i> (%):		
1	22 (66,7)	24 (82,8)
2	11 (33,3)	5 (17,2)
Донор, <i>n</i> (%): Donor, <i>n</i> (%):		
гаплоидентичный haploidentical	29 (87,9)	26 (89,7)
10/10 совместимый родственный 10/10 matched related	1 (3)	1 (3,5)
10/10 совместимый неродственный 10/10 matched unrelated	3 (9,1)	2 (6,8)
Приживление, <i>n</i> (%) Engraftment, <i>n</i> (%)	30 (90,9)	29 (100)
Основные результаты The main outcomes		
Острая РТПХ II–IV стадии, % Grade II–IV acute GvHD, %	12,2 (4,9–30,5)	17,7 (8–39,3)
		<i>p</i> = 0,546
Острая РТПХ III–IV стадии, % Grade III–IV acute GvHD, %	6,1 (0,1–23,2)	8,2 (2,2–31,1)
		<i>p</i> = 0,823
Хроническая РТПХ, % Chronic GvHD, %	5,0 (0,6–41,2)	7,9 (0,2–29,7)
		<i>p</i> = 0,503
КВР/П, % CPR/P, %	50,3 (39,8–70,9)	44,0 (28,5–68,0)
		<i>p</i> = 0,430
ТС, % TRM, %	6,1 (1,6–23,2)	0
		<i>p</i> = 0,181
БСВ, % EFS, %	43,6 (26,0–61,2)	56,0 (36,8–75,1)
		<i>p</i> = 0,195
ОВ, % OS, %	58,2 (40,7–75,8)	59,3 (40,4–78,3)
		<i>p</i> = 0,733

вила 58,2% (95% ДИ 40,7–75,8), в группе Т-ОЛЛ – 25% (95% ДИ 0–55), *p* = 0,063 (рисунки 5).

Среди оцениваемых факторов значимые различия в ОВ были получены при сравнении пациентов в зависимости от наличия признаков РТПХ. При наличии любых проявлений РТПХ

(для 78,7% РТПХ I стадии) ОВ была значительно лучше по сравнению с пациентами, не имевшими этих проявлений (73,0% против 38,1%; *p* = 0,034) (рисунки 6), что, по-видимому, связано с меньшей частотой рецидивов (42,6% против 64,8%; *p* = 0,210).

Таблица 5

Соотношение между отдельными характеристиками пациентов и исходами ТГСК

Table 5

A correlation between some patient characteristics and HSCT outcomes

Характеристика Characteristics		Число пациентов, n Number of patients, n	КВР/П, % CPR/P, %	95% ДИ 95% CI	p	ТС, % TRM, %	95% ДИ 95% CI	p	БСВ, % EFS, %	95% ДИ 95% CI	p	ОВ, % OS, %	95% ДИ 95% CI	p
№ ТГСК HSCT №	1	31	59,2	44,2–79,3	0,115	6,5	1,7–24,7	0,806	34,3	17,2–51,4	0,141	50,8	33,0–68,7	0,629
	2	12	33,3	15,3–72,8		8,3	1,3–54,4		58,3	30,4–86,2		50,9	19,9–81,9	
Кондиционирование с циторедуктивной профазой Conditioning with a cytoreductive prophase	Да Yes	14	57,1	36,3–89,9	0,363	7,1	1,1–47,2	1,000	35,7	10,6–60,8	0,381	34,7	39,6–76,0	0,227
	Нет No	29	48,8	33,9–70,1		6,9	1,8–26,3		44,3	26,1–62,6		57,8	6,1–63,4	
CD34 в трансплантате CD34 in the transplant	> медианы > the median	21	61,9	44,9–85,4	0,263	4,8	0,7–32,2	0,582	33,3	13,2–53,5	0,469	52,4	31–73,7	0,898
	< медианы < the median	22	40,9	25–67		9,1	2,4–34,1		50	29,1–70,9		50,5	28–73	
Возраст пациента Patient age	> медианы > the median	25	48	32,5–71	0,601	8	2,1–30,2	0,738	44	24,5–63,5	0,785	44	23,4–64,6	0,474
	< медианы < the median	18	56,9	37,7–85,9		5,6	0,8–37,3		37,5	14,6–60,4		60,6	37,8–83,4	
Диагноз Diagnosis	ОМЛ AML	33	50,3	35,8–70,9	0,300	6,1	1,6–23,2	0,561	43,6	26,0–61,2	0,158	58,2	40,7–75,8	0,063
	Т-ОЛЛ T-ALL	8	62,5	36,5–106,9		12,5	2–78,2		25,0	0–55		25,0	0–55	
Стадия заболевания Stage of the disease	Первично-рефрактерное течение Primary refractory disease	14	71,4	51,3–99,5	0,122	0		0,218	28,6	4,9–52,4	0,430	64,3	39,2–89,4	0,279
	Рефрактерный рецидив Refractory relapse	29	41,4	27,1–63,1		10,3	3,3–30,3		48,3	30,1–66,5		43,8	24,5–63,2	
Острая РТПХ I–IV стадии Grade I–IV acute GvHD	Да Yes	19	42,6	25,1–72,1	0,210	0		0,342	57,4	35–79,9	0,124	73	52,7–93,3	0,034
	Нет No	21	64,8	46,1–91		4,8	0,7–32,2		30,5	9,2–51,8		38,1	15,8–60,4	

Рисунок 5

ОВ (А) и БСВ (Б) в группе пациентов с ОМЛ (красная линия) и Т-ОЛЛ (синяя линия)

Figure 5

OS (A) and EFS (B) in the group of patients with AML (red line) and T-ALL (blue line)

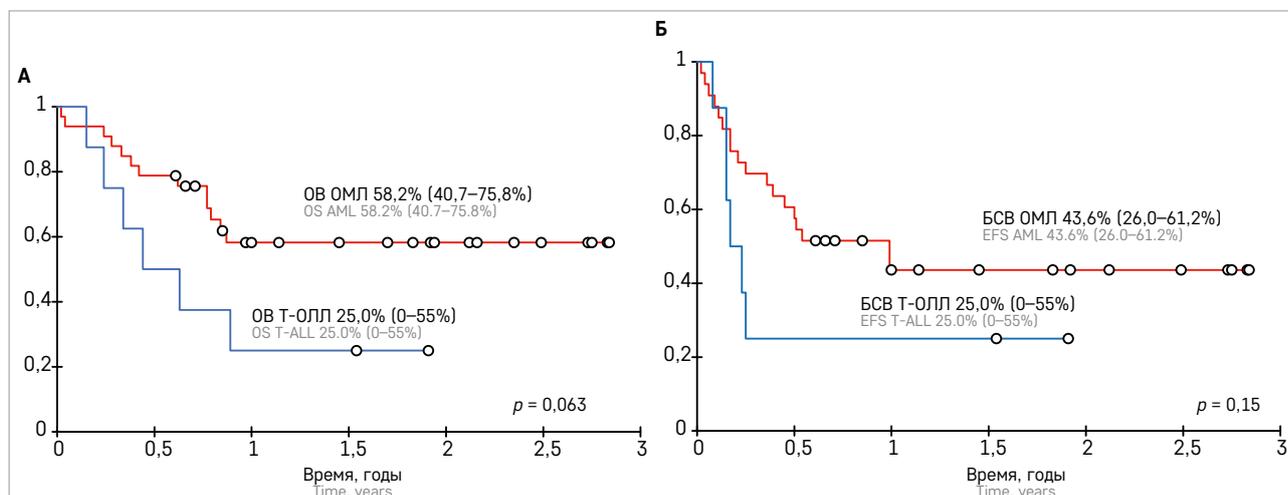
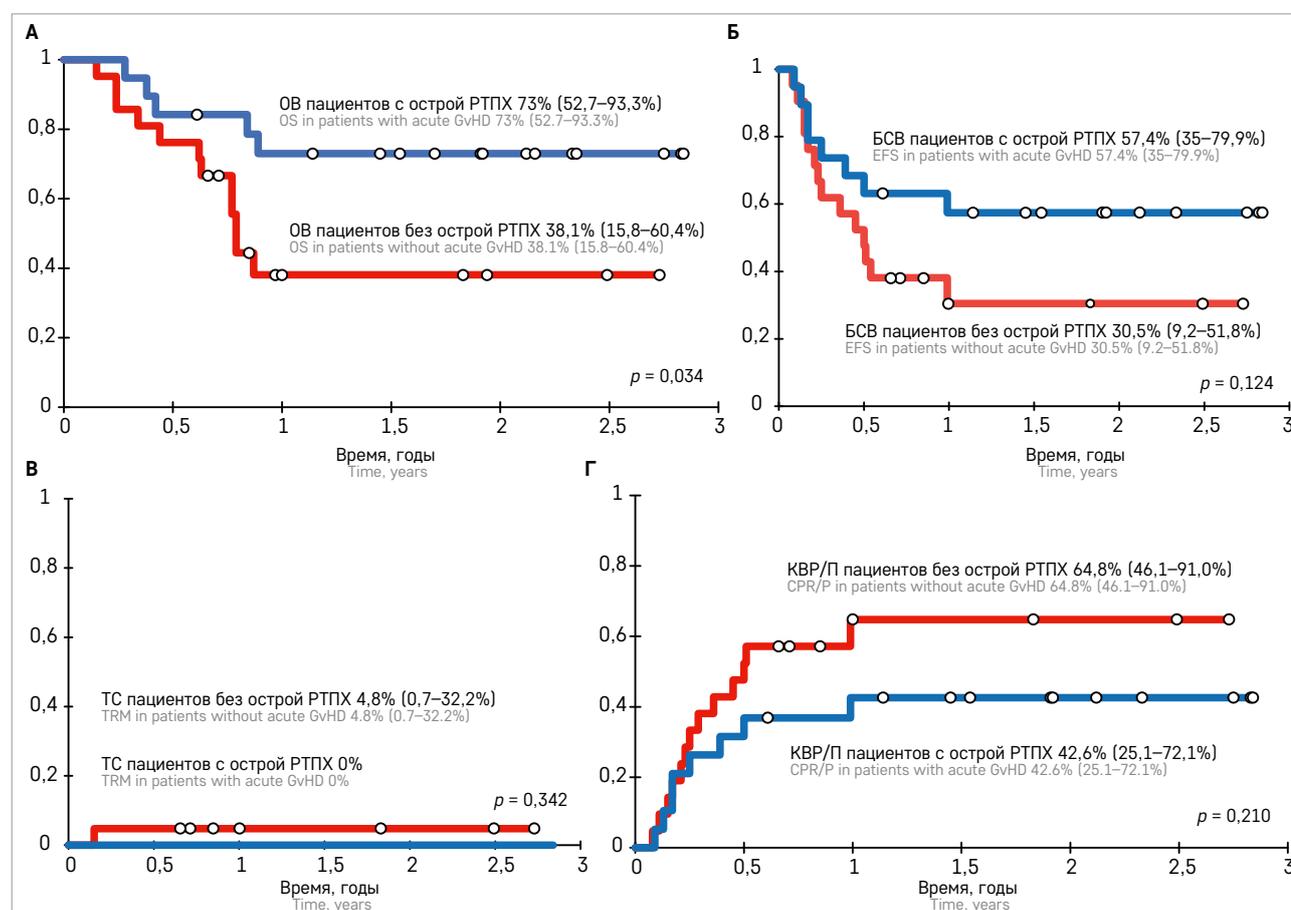


Рисунок 6

Соотношение основных исходов среди пациентов с РТПХ I–IV стадии (красная линия) и без РТПХ (синяя линия) А – ОВ; Б – БСВ; В – ТС; Г – КВР/П

Figure 6

The main outcomes among the patients with grade I–IV GvHD (red line) and without GvHD (blue line) А – OS; Б – EFS; В – TRM; Г – CPR/P



Иммунореконституция

Раннее восстановление ключевых субпопуляций лимфоцитов было сравнимым со средними показателями в нашем Центре: на 30-е сутки медиана для Т-лимфоцитов – $0,119 \times 10^6/\text{кг}$, для $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов – $0,108 \times 10^6/\text{кг}$, для $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов – $0,10 \times 10^6/\text{кг}$; однако среднее количество NK-клеток было значительно ниже ($0,145 \times 10^6/\text{кг}$). Мы отметили несоответствие в восстановлении NK-клеток по сравнению с предыдущими отчетами и проверили потенциальное влияние даратумумаба на данный показатель. Было проведено сравнение между пациентами, получавшими и не получавшими даратумумаб. Медиана количества NK-клеток у пациентов, не получавших даратумумаб, составила $0,207 \times 10^6/\text{кг}$, у получавших – $0,106 \times 10^6/\text{кг}$ ($p = 0,251$).

С учетом недостоверной разницы в восстановлении NK-клеток в этой относительно небольшой выборке мы сравнили этот показатель у пациентов из данной когорты, получавших даратумумаб ($n = 20$), с историческим контролем (пациенты с ОМЛ вне ремиссии, получавшие кондиционирование без даратумумаба и идентичный режим профилак-

тики РТПХ ($n = 33$). Медиана количества NK-клеток на +30-й день после ТГСК у пациентов, получавших даратумумаб, составила $0,074 \times 10^6/\text{кг}$, а в группе пациентов без добавления даратумумаба – $0,357 \times 10^6/\text{кг}$ ($p < 0,001$) (рисунок 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аллогенная ТГСК является единственным методом лечения химиорефрактерных форм ОЛ. Известно, что ряд факторов, включая интенсивность режима кондиционирования, опухолевую нагрузку на момент трансплантации, исходные цитогенетические аномалии, развитие острой и хронической РТПХ и аллореактивность NK-клеток у гаплоидентичных доноров, являются прогностическими для исходов трансплантации [26–28]. Ранее нами продемонстрировано, что гаплоидентичная ТГСК на платформе селективной деплеции Т-лимфоцитов способна контролировать лейкоз у значительной части детей с ОМЛ с минимальным уровнем РТПХ и, следовательно, высоким качеством жизни больных [5]. Несмотря на замену антилимфоцитарного глобулина на нелимфоде-

Рисунок 7

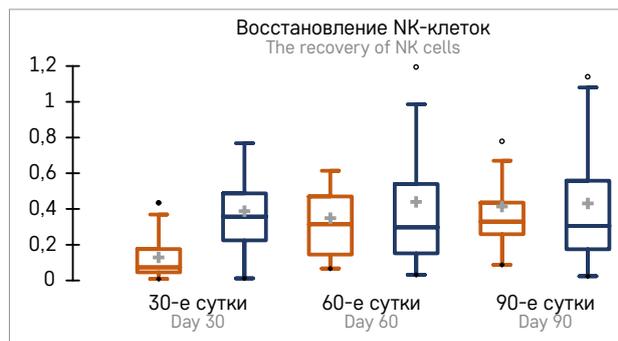
Сопоставление медианы NK-клеток на +30, +60, +90-е сутки после ТГСК между пациентами, получавшими и не получавшими даратумумаб в кондиционировании

Число пациентов в группе, получавшей даратумумаб – 20, в группе без даратумумаба – 33

Figure 7

A comparison of the median NK cell count on Day +30, +60, +90 after HSCT in patients treated with daratumumab and those not treated with daratumumab during the conditioning regimen

The number of patients in the daratumumab group and non-daratumumab group is 20 and 33, respectively



плецирующие агенты в более позднем исследовании, нам не удалось улучшить результат – частота рецидивов сохранялась на уровне 50%. Для дальнейшего совершенствования подхода мы предположили, что включение в режимы кондиционирования таргетных препаратов с потенциальным синергизмом и не перекрывающимися профилями токсичности с цитотоксическими агентами в кондиционировании сможет повысить антилейкемическую активность ТГСК.

Выбранные таргетные препараты были широко изучены ранее в ходе доклинических исследований, испытаний ранней фазы и многочисленных описаний клинических случаев. В частности, венетоклакс показал многообещающую активность при детском лейкозе и может безопасно сочетаться как с низкодозной, так и с высокодозной химиотерапией, включая недавний отчет о его использовании в рамках режима кондиционирования пониженной интенсивности [17–19, 29–34]. Плериксафор прошел широкие испытания, в ходе которых был продемонстрирован синергизм с химиотерапией, а также безопасность комбинации с режимами кондиционирования при лейкемии у взрослых и детей с первичными иммунодефицитами [13, 15, 16, 20, 35]. Таргетирование CD38 с помощью даратумумаба при детском ОЛ в настоящее время изучается в клинических испытаниях. Многочисленные сообщения свидетельствуют о безопасности применения даратумумаба после ТГСК, в то время как сообщений о его применении в составе подготовительных схем на настоящий момент нет [12, 14, 36, 37].

В данном исследовании мы оценивали поверхностную экспрессию потенциальных мишеней в когорте детей с химиорефрактерными лейкозами.

Во всех изученных случаях была показана высокая (> 80%) экспрессия по крайней мере 1 маркера. Экспрессия CD38 была одинаково высокой для пациентов с ОМЛ и Т-ОЛЛ, что согласуется с данными литературы [10–12, 38, 39]. Различный уровень экспрессии VCL-2 и CD184 для ОМЛ и Т-ОЛЛ в целом также коррелирует с литературными данными [7–9, 40]. Следует отметить, что пороговая экспрессия отдельных белков, необходимая для эффективного клинического таргетирования, не установлена.

Касательно безопасности подхода, наши результаты свидетельствуют о том, что включение таргетных агентов в установленную основу миелоаблативного кондиционирования имеет хорошую переносимость. Не было зарегистрировано чрезмерных немедленных или отсроченных нежелательных явлений, а также не отмечено негативного влияния на основные результаты ТГСК, включая приживление, контроль РТПХ и инфекций. Смерти, не связанные с основным заболеванием, во всех случаях были вызваны инфекционными осложнениями у пациентов, а уровень ТС был сопоставим с результатами, показанными нами ранее [5]. Важно отметить, что вторая ТГСК с включением таргетных агентов на основе томотерапии с ТОТ (проведенная у 10 из 12 пациентов, получивших вторую ТГСК) также продемонстрировала сопоставимый профиль безопасности по сравнению с пациентами, получившими первую ТГСК (таблица 5). В целом наши данные подтверждают, что каждый из таргетных препаратов, отдельно или в комбинации, может быть безопасно добавлен к высокодозной химиотерапии и облучению, как сообщалось в более ранних исследованиях среди взрослых [15–18, 41].

Пилотное исследование и ретроспективный анализ не были предназначены для проверки антилейкемического эффекта подхода. МОБ-негативная ремиссия была достигнута в 37 (86,3%) случаях, что подтверждает наши предыдущие наблюдения о циторедуктивной способности миелоаблации для данных пациентов. Долгосрочное наблюдение выявило устойчиво высокую частоту рецидивов, которая достигла 52,3% в общей когорте, 50,3% в подгруппе ОМЛ и 62,5% в подгруппе Т-ОЛЛ. Двухлетняя БСВ составила 43,6% и была близка к нашим предыдущим результатам, незначительное повышение уровня ОВ (58,2%) было связано с успешными повторными ТГСК после рецидива. Таким образом, в настоящее время мы не видим доказательств того, что добавление таргетной терапии к режиму кондиционирования повысило возможности ТГСК в обеспечении долгосрочного контроля над заболеванием.

Для Т-ОЛЛ долгосрочные результаты и вовсе оказались разочаровывающими, поскольку добавление таргетных препаратов и использование

«расщепленных» режимов кондиционирования приводило лишь к единичным позитивным исходам. Примечательно, что у 4 из 5 пациентов после циторедуктивной фазы с включением даратумумаба к моменту инициализации основного этапа кондиционирования было отмечено прогрессирование лейкоза.

Неудовлетворительные результаты добавления венетоклакса к схемам терапии также могут быть связаны с высокой экспрессией MCL-1 и BCL-xL. Венетоклак является высокоселективным ингибитором BCL-2, при этом активность антиапоптотических белков MCL-1 и BCL-xL сохраняется [42]. Среди 37 пациентов, получавших венетоклак, данные об экспрессии MCL-1 и BCL-xL были доступны только для 11 и характеризовались высоким уровнем экспрессии (медиана для MCL-1 100%, для BCL-xL 93%).

Следует также отметить, что мы наблюдали влияние даратумумаба на восстановление NK-клеток. CD38 в том числе экспрессируется на NK-клетках, а даратумумаб, как известно, оказывает влияние на количество NK-клеток у пациентов с множественной миеломой. Технология истощения $\alpha\beta$ -T-лимфоцитов была разработана с учетом антилейкемического потенциала NK-клеток и $\gamma\delta$ -T-лимфоцитов. Раннее восстановление и активация этих цитотоксических субпопуляций в отсутствие тяжелой РТПХ потенциально компенсируют отсутствие аллореактивности пула T-лимфоцитов как механизма борьбы с опухолью [43–45]. Наши результаты показывают, что добавление даратумумаба оказывает статистически значимое влияние на восстановление NK-клеток, что впоследствии может негативно сказаться на развитии эффекта «трансплантат против лейкемии».

Важным наблюдением стала значительно более высокая выживаемость у пациентов с любыми (даже минимальными) признаками РТПХ. Многие ретроспективные анализы групп пациентов, получивших ТГСК по поводу гематологических злокачественных новообразований, выявили значительную связь между

частотой возникновения РТПХ и снижением частоты рецидивов [46–49]. В нашей когорте наблюдаются значительно лучшие показатели выживаемости у пациентов с любыми проявлениями РТПХ, учитывая тот факт, что их подавляющее большинство (78,7%) имели РТПХ I стадии. Эти результаты также могут подтверждать связь между РТПХ и эффектом «трансплантат против лейкемии».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно отметить, что использование даратумумаба, венетоклакса и плериксафора в подготовительных схемах у детей с химиорезистентными формами ОЛ безопасно и не ухудшает приживление трансплантата, контроль РТПХ и инфекций. В долгосрочной перспективе этот подход не показал значительного улучшения результатов трансплантации при химиорефрактерном ОМЛ и подтвердил неудовлетворительные результаты при Т-ОЛЛ, если ТГСК проводилась вне ремиссии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ №075-15-2020-807.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Klimentova M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1216-817X>

Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>

Ilushina M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7652-7704>

Blagov S.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8754-1376>

Perminova M.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7387-9197>

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

Kashpor S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5220-7412>

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

Glushkova S.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6607-1384>

Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>

Balashov D.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2689-0569>

Maschan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>

Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература

1. Locatelli F., Merli P., Pagliara D., Li Pira G., Falco M., Pende D., et al. Outcome of children with acute leukemia given HLA-haploidentical HSCT after $\alpha\beta$ T-cell and B-cell depletion. *Blood* 2017; 130 (5): 677–85. DOI: 10.1182/blood-2017-04-779769
2. Weisdorf D.J., Millard H.R., Horowitz M.M., Hyare P.S., Champalin R., Ho V., et al. Allogeneic transplantation for advanced acute myeloid leukemia: The value of complete remission. *Cancer* 2017; 123 (11): 2025–34. DOI: 10.1002/cncr.30536
3. Duval M., Klein J.P., He W., Cahn J.Y., Cairo M., Camitta B.M., et al. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Acute Leukemia in Relapse or Primary Induction Failure. *J Clin Oncol* 2010; 28 (23): 3730–8. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.8852
4. Pavlů J., Labopin M., Zoellner A.K., Sakellari I., Stelljes M., Finke J., et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for primary refractory acute lymphoblastic leukemia: A report from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Cancer* 2017; 123 (11): 1965–70. DOI: 10.1002/cncr.30604
5. Shelikhova L., Ilushina M., Shekhovtsova Z., Shasheleva D., Khismatullina R., Kurnikova E., et al. $\alpha\beta$ T Cell-Depleted Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplan-

- tation without Antithymocyte Globulin in Children with Chemorefractory Acute Myelogenous Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; 25 (5): e179–82. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.01.023
6. Angeles-Florian T., Rivera-Torruco G., García-Maldonado P., Juárez E., Gonzalez Y., Parra-Ortega I., et al. Cell surface expression of *GRP78* and *CXCR4* is associated with childhood high-risk acute lymphoblastic leukemia at diagnostics. *Sci Rep* 2022; 12 (1): 2322. DOI: 10.1038/s41598-022-05857-w
 7. Aref S., Salama O., Al-Tonbary Y., Mansour A. Assessment of bcl-2 expression as modulator of fas mediated apoptosis in acute leukemia. *Hematology* 2004; 9 (2): 113–21. DOI: 10.1080/1024533042000205496
 8. Ahn J.Y., Seo K., Weinberg O.K., Arber D.A. The prognostic value of *CXCR4* in acute myeloid leukemia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013; 21 (1): 79–84.
 9. Bensi L., Longo R., Vecchi A., Messora C., Garagnani L., Bernardi S., et al. Bcl-2 oncoprotein expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1995; 80 (2): 98–102.
 10. Keyhani A., Huh Y.O., Jendiroba D., Pagliaro L., Cortez J., Pierce S., et al. Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. *Leuk Res* 2000; 24 (2): 153–9. DOI: 10.1016/S0145-2126(99)00147-2
 11. Tembhare P.R., Sriram H., Khanka T., Chatterjee G., Panda D., Ghogale S., et al. Flow cytometric evaluation of CD38 expression levels in the newly diagnosed T-cell acute lymphoblastic leukemia and the effect of chemotherapy on its expression in measurable residual disease, refractory disease and relapsed disease: an implication for anti-CD38 immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2020; 8 (1): e000630. DOI: 10.1136/jitc-2020-000630
 12. Bride K.L., Vincent T.L., Im S.Y., Aplenc R., Barrett D.M., Carroll W.L., et al. Preclinical efficacy of daratumumab in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2018; 131 (9): 995–9. DOI: 10.1182/blood-2017-07-794214
 13. Michelis F.V., Hedley D.W., Malhotra S., Chow S., Loach D., Gupta V., et al. Mobilization of Leukemic Cells Using Plerixafor as Part of a Myeloablative Preparative Regimen for Patients with Acute Myelogenous Leukemia Undergoing Allografting: Assessment of Safety and Tolerability. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; 25 (6): 1158–63. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.01.014
 14. Bonda A., Punatar S., Gokarn A., Mohite A., Shanmugam K., Nayak L., et al. Daratumumab at the frontiers of post-transplant refractory T-acute lymphoblastic leukemia—a worthwhile strategy? *Bone Marrow Transplant* 2018; 53 (11): 1487–9. DOI: 10.1038/s41409-018-0222-5
 15. Maganti H., Visram A., Shorr R., Fulcher J., Sabloff M., Allan D.S. Plerixafor in combination with chemotherapy and/or hematopoietic cell transplantation to treat acute leukemia: A systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies. *Leuk Res* 2020; 97: 106442. DOI: 10.1016/j.leukres.2020.106442
 16. Mori T., Kikuchi T., Yamazaki R., Koda Y., Saburi M., Sakurai M., et al. Phase 1 study of plerixafor in combination with total body irradiation-based myeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2021; 113 (6): 877–83. DOI: 10.1007/s12185-021-03109-7
 17. Bewersdorf J.P., Derkach A., Gowda L., Menghrajani K., DeWolf S., Ruiz J.D., et al. Venetoclax-based combinations in AML and high-risk MDS prior to and following allogeneic hematopoietic cell transplant. *Leuk Lymphoma* 2021; 62 (14): 3394–401. DOI: 10.1080/10428194.2021.1966788
 18. Garcia J.S., Kim H.T., Murdock H.M., Cutler C.S., Brock J., Gooptu M., et al. Adding venetoclax to fludarabine/busulfan RIC transplant for high-risk MDS and AML is feasible, safe, and active. *Blood Adv* 2021; 5 (24): 5536–45. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021005566
 19. Pullarkat V.A., Lacayo N.J., Jabbour E., Rubnitz J.E., Bajel A., Laetsch T.W., et al. Venetoclax and Navitoclax in Combination with Chemotherapy in Patients with Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Cancer Discov* 2021; 11 (6): 1440–53. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1465
 20. Balashov D., Laberko A., Shcherbina A., Trakhtman P., Abramov D., Gutovskaya E., et al. A Conditioning Regimen with Plerixafor Is Safe and Improves the Outcome of TCR $\alpha\beta^+$ and CD19 $^+$ Cell-Depleted Stem Cell Transplantation in Patients with Wiskott–Aldrich Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; 24 (7): 1432–40. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.03.006
 21. Estey E.H. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2018; 93 (10): 1267–91. DOI: 10.1002/ajh.25214
 22. Przepiorka D., Weisdorf D., Martin P., Klingemann H.G., Beatty P., Hows J., Thomas E.D. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15 (6): 825–8.
 23. Shulman H.M., Cardona D.M., Greenson J.K., Hingorani S., Horn T., Huber E., et al. NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (4): 589–603. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.031
 24. Blagov S., Zvyagin I.V., Shelikhova L., Khismatullina R., Balashov D., Komech E., et al. T-cell tracking, safety, and effect of low-dose donor memory T-cell infusions after $\alpha\beta$ T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2021; 56 (4): 900–8. DOI: 10.1038/s41409-020-01128-2
 25. Maschan M., Blagov S., Shelikhova L., Shekhovtsova Z., Balashov D., Starichkova J., et al. Low-dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted unrelated and haploidentical transplantation: results of a pilot trial. *Bone Marrow Transplant* 2018; 53 (3): 264–73. DOI: 10.1038/s41409-017-0035-y
 26. Molina B., Gonzalez Vicent M., Herrero B., Deltoro N., Ruiz J., Perez Martinez A., et al. Kinetics and Risk Factors of Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Children with Leukemia: A Long-Term Follow-Up Single-Center Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; 25 (1): 100–6. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.08.012
 27. Zhu C.Y., Chen G.F., Zhou W., Hou C., Wang X.K., Wang F.Y., et al. Outcome and Prognostic Factors of High-Risk Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Ann*

- Transplant 2019; 24: 328–40. DOI: 10.12659/AOT.915381
28. Han D.-M., Zheng X.-L., Ding L., Yan H.-M., Wang Z.D., Xue M., et al. Risk factors in patients undergoing haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for high-risk childhood acute leukemia. *Int J Hematol* 2017; 106 (6): 820–31. DOI: 10.1007/s12185-017-2317-y
 29. Karol S.E., Alexander T.B., Budhraj A., Pounds S.B., Canavera K., Wang L., et al. Venetoclax in combination with cytarabine with or without idarubicin in children with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a phase 1, dose-escalation study. *Lancet Oncol* 2020; 21 (4): 551–60. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30060-7
 30. Shahswar R., Beutel G., Klement P., Rehberg A., Gabdoulline R., Koencke C., et al. FLA-IDA salvage chemotherapy combined with a seven-day course of venetoclax (FLA-VIDA) in patients with relapsed/refractory acute leukaemia. *Br J Haematol* 2020; 188 (3): e11–5. DOI: 10.1111/bjh.16268
 31. Gibson A., Trabal A., McCall D., Khazal S., Toepfer L., Bell D.H., et al. Venetoclax for Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Cancers (Basel)* 2021; 14 (1) 150. DOI: 10.3390/cancers14010150
 32. DiNardo C.D., Lachowicz C.A., Takahashi K., Loghavi S., Xiao L., Kadia T., et al. Venetoclax Combined With FLAG-IDA Induction and Consolidation in Newly Diagnosed and Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2021; 39 (25): 2768–78. DOI: 10.1200/JCO.20.03736
 33. Contejean A., Palmic P., Kosmider O., Belhadj M., Willems L., Lengliné E., et al. Successful nelarabine and venetoclax treatment of a relapsed/refractory mediastinal myeloid sarcoma with clonal TCR rearrangement. *Anticancer Drugs* 2021; 32 (10): 1118–22. DOI: 10.1097/CAD.0000000000001105
 34. Zhang X., Li J., Jin J., Yu W. Relapsed/refractory early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia was salvaged by venetoclax plus HAG regimen. *Ann Hematol* 2020; 99 (2): 395–7. DOI: 10.1007/s00277-019-03902-9
 35. Yang X., Wan M., Yu F., Wang Z. Efficacy and safety of plerixafor for hematopoietic stem cell mobilization for autologous transplantation in patients with non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis. *Exp Ther Med* 2019; 18 (2): 1141–8. DOI: 10.3892/etm.2019.7691
 36. Lonial S., Weiss B.M., Usmani S.Z., Singhal S., Chari A., Bahlis N.J., et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2016; 387 (10027): 1551–60. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01120-4
 37. Vogiatzi F., Winterberg D., Lenk L., Buchmann S., Cario G., Schrappe M., et al. Daratumumab eradicates minimal residual disease in a preclinical model of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2019; 134 (8): 713–6. DOI: 10.1182/blood.2019000904
 38. Farber M., Chen Y., Arnold L., Möllmann M., Boog-Whiteside E., Lin Y.A., et al. Targeting CD38 in acute myeloid leukemia interferes with leukemia trafficking and induces phagocytosis. *Sci Rep* 2021; 11 (1): 22062. DOI: 10.1038/s41598-021-01300-8
 39. Koehler M., Behm F., Hancock M., Pui C.H. Expression of activation antigens CD38 and CD71 is not clinically important in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993; 7 (1): 41–5.
 40. Mannelli F., Cutini I., Gianfaldoni G., Bencini S., Scappini B., Pancani F., et al. CXCR4 expression accounts for clinical phenotype and outcome in acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; 86 (5): 340–9. DOI: 10.1002/cyto.b.21156
 41. Konopleva M., Benton C.B., Thall P.F., Zeng Z., Shpall E., Ciurea S., et al. Leukemia cell mobilization with G-CSF plus plerixafor during busulfan-fludarabine conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50 (7): 939–46. DOI: 10.1038/bmt.2015.58
 42. Hafezi S., Rahmani M. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. *Cancers (Basel)* 2021; 13 (6): 1292. DOI: 10.3390/cancers13061292
 43. Lang P., Feuchtinger T., Teltschik H.M., Schwinger W., Schlegel P., Pfeiffer M., et al. Improved immune recovery after transplantation of TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50 Suppl 2: S6–10. DOI: 10.1038/bmt.2015.87
 44. Handgretinger R., Lang P., André M.C. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (26): 3341–9. DOI: 10.1182/blood-2015-12-629055
 45. Chaleff S., Otto M., Barfield R.C., Leimig T., Iyengar R., Martin J., et al. A large-scale method for the selective depletion of alpha-beta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy* 2007; 9 (8): 746–54. DOI: 10.1080/14653240701644000
 46. Kato M., Kurata M., Kanda J., Kato K., Tomizawa D., Kudo K., et al. Impact of graft-versus-host disease on relapse and survival after allogeneic stem cell transplantation for pediatric leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2019; 54 (1): 68–75. DOI: 10.1038/s41409-018-0221-6
 47. Baron F., Labopin M., Niederwieser D., Vigouroux S., Cornelissen J.J., Malm C., et al. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia* 2012; 26 (12): 2462–8. DOI: 10.1038/leu.2012.135
 48. Valcárcel D., Martino R., Caballero D., Martin J., Ferra C., Nieto J.B., et al. Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: chronic graft-versus-host disease is the strongest factor improving survival. *J Clin Oncol* 2008; 26 (4): 577–84. DOI: 10.1200/JCO.2007.11.1641
 49. Sweeney C., Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol* 2019; 9: 1217. DOI: 10.3389/fonc.2019.01217

© 2023 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 19.07.2023
Принята к печати 14.08.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-28-35

Успех повторной аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток со сменой донора при потере гетерозиготности HLA у пациента с ювенильным миеломоноцитарным лейкозом: анализ серии клинических случаев

Л.А. Цветкова, А.А. Осипова, А.В. Евдокимов, П.В. Кожокар, Ж.З. Рахманова, И.М. Бархатов, О.В. Паина, О.С. Епифановская, Е.В. Бабенко, Н.Е. Иванова, Д.В. Козлов, Т.Л. Гиндина, Т.А. Быкова, Е.В. Семенова, Л.С. Зубаровская

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ) – редкое и агрессивное миелопролиферативное/миелодиспластическое новообразование у детей раннего возраста, характеризующееся активацией сигнального пути Ras. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является единственным доказанным излечивающим методом терапии ЮММЛ. Тем не менее 5-летняя общая выживаемость составляет 52–64%. В данной работе проанализировано 4 клинических случая пациентов с рецидивами ЮММЛ после алло-ТГСК, у которых ретроспективно была определена потеря гетерозиготности по генам HLA, расположенным в области короткого плеча 6-й хромосомы. Родители пациентов дали согласие на использование информации, в том числе фотографий детей, в научных исследованиях и публикациях. Два пациента получили повторную алло-ТГСК со сменой донора, 2 – без смены донора. Положительный результат в виде достижения стойкой ремиссии наблюдался у 1 пациента, прошедшего повторную алло-ТГСК со сменой донора и восстановившего генетическую гетерозиготность HLA. В то же время иммунотерапия инфузиями донорских лимфоцитов приводила к развитию реакции «трансплантат против хозяина» без потенцирования противолейкемического эффекта. Таким образом, повторная алло-ТГСК со сменой донора в контексте терапии рецидива ЮММЛ, ассоциированного с потерей HLA, приводит к возврату генетической экспрессии HLA, что необходимо для восстановления реакции «трансплантат против ЮММЛ». Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

Ключевые слова: ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, потеря HLA

Цветкова Л.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 28–35. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-28-35

A successful second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor in a patient with loss of HLA heterozygosity relapse of juvenile myelomonocytic leukemia: case series analysis

L.A. Tsvetkova, A.A. Osipova, A.V. Evdokimov, P.V. Kozhokar, Zh.Z. Rakhmanova, I.M. Barkhatov, O.V. Paina, O.S. Epifanovskaya, E.V. Babenko, N.E. Ivanova, D.V. Kozlov, T.L. Gindina, T.A. Bykova, E.V. Semenova, L.S. Zubarovskaya

The R.M. Gorbacheva Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is a rare and aggressive myeloproliferative/myelodysplastic neoplasm of early childhood characterized by activation of the Ras signaling pathway. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the only proven curative treatment for JMML. However, the 5-year overall survival is about 52–64%. In this work, we analyzed 4 clinical cases of patients with relapses of JMML with loss of heterozygosity in HLA (LoH) after allo-HSCT. The patients' parents gave their consent to the use of their children's data, including photographs, for research purposes and in publications. Two patients received a second allo-HSCT from an alternative donor, two patients – from the same donor. A positive result in the form of a durable remission was observed in one patient who underwent a second allo-HSCT from an alternative donor and restored HLA genetic heterozygosity. At the same time, immunotherapy with infusions of donor lymphocytes led to the development of graft-versus-host disease without potentiating the antileukemic effect. Thus, a second allo-HSCT from an alternative donor for the treatment of relapsed JMML with HLA LoH is necessary to restore the "graft-versus-JMML" response. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Key words: juvenile myelomonocytic leukemia, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, HLA loss

Tsvetkova L.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 28–35.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-28-35

Контактная информация:

Цветкова Любовь Александровна,
врач-гематолог отделения трансплантации
костного мозга для детей №1 НИИ
детской онкологии, гематологии и
трансплантологии им. Р.М. Горбачевой
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
Минздрава России
Адрес: 197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6/8
E-mail: tsvetluibov@mail.ru

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 19.07.2023
Accepted 14.08.2023

Correspondence:
Lyubov A. Tsvetkova,
a hematologist at the Pediatric Bone Marrow
Transplantation Department №1
at the R.M. Gorbacheva Research Institute for
Pediatric Oncology, Hematology and
Transplantation of the I.P. Pavlov First Saint
Petersburg State Medical University
of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: Leo Tolstoy St. 6/8,
St. Petersburg 197022, Russia
E-mail: tsvetluibov@mail.ru

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ) – редкое и агрессивное миело-пролиферативное/миелодиспластическое новообразование у детей раннего возраста, встречающееся у 1,2 на 1 млн детей в год, что составляет 2% детских гематологических злокачественных новообразований. Медиана возраста на момент диагноза составляет менее 2 лет. Заболевание характеризуется гепатоспленомегалией, лейкоцитозом, тромбоцитопенией, абсолютным моноцитозом > 1000/мкл с циркулирующими незрелыми миелоидными предшественниками, увеличением уровня фетального гемоглобина, количеством бластов в костном мозге (КМ) менее 20%. В основе патогенеза ЮММЛ лежит нарушение регуляции внутриклеточного пути передачи сигнала Ras, вызванное в > 90% случаев мутациями в 1 из 5 первичных генов (*PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1* или *CBL*) [1, 2]. Для большинства пациентов аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является единственным излечивающим вариантом терапии. Тем не менее 5-летняя общая выживаемость (ОВ) составляет 52–64% [3, 4]. Однако рецидивы заболевания достигают 25–50% и остаются основной причиной неудачи алло-ТГСК [4, 5]. Базируясь на результатах посттрансплантационной иммунотерапии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [6, 7], ранняя отмена иммуносупрессивной терапии (ИСТ), инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) в монотерапии или в сочетании с 5-азациитидином могут быть использованы у пациентов с высоким риском развития рецидива ЮММЛ после алло-ТГСК. Немногочисленные исследования демонстрируют потенциальную эффективность ИДЛ у ограниченного числа пациентов с ЮММЛ [8]. Опубликованные данные об эффективности комбинированной профилактической терапии у детей с ЮММЛ отсутствуют. В случае развития рецидива повторная алло-ТГСК со сменой донора или без нее может быть «терапией спасения» у 30–40% пациентов [3, 9, 10].

Потеря гетерозиготности HLA, происходящая приблизительно у трети пациентов в случае рецидива острого лейкоза после частично совместимой алло-ТГСК, имеет большое значение для определения прогноза и тактики ведения больного. Ввиду необходимости восстановления чувствительности к иммуноадаптивной терапии выполнение повторной алло-ТГСК со сменой донора при данном варианте рецидива может быть методом выбора [11, 12]. Данные об участии этого механизма в эволюции ЮММЛ ранее не были описаны.

В данной работе впервые описаны случаи потери гетерозиготности по генам HLA у детей с рецидивами ЮММЛ после алло-ТГСК. Родители пациентов дали согласие на использование информации, в том

числе фотографий детей, в научных исследованиях и публикациях. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В анализ включены 4 пациента с диагнозом ЮММЛ: 2 мальчика и 2 девочки. Медиана возраста составила 2,5 года (2–5 лет) на момент постановки диагноза. Диагноз ЮММЛ был установлен на основании клинических данных (гепатоспленомегалия, лимфаденопатия, лихорадка), картины периферической крови (лейкоцитоз > 10 000/мкл, тромбоцитопения, абсолютное число моноцитов > 1000/мкл), данных миелограммы (гиперклеточный КМ с количеством бластов < 20%, миеломоноцитарная гиперплазия). Всем пациентам проводилось цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование. Моносомия 7-й хромосомы обнаружена у 2 пациентов, нормальный кариотип – в 2 случаях. Драйверные мутации были выявлены у всех пациентов: *PTNP11* – у 3, *N-RAS* – у 1.

У 1 пациента диагноз был установлен в стадии трансформации в острый лейкоз со смешанным фенотипом: 28% бластов в КМ, по данным иммунофенотипирования выявлены 2 популяции бластных клеток (4,5% В-линейной направленности, 9,1% миелоидной направленности). Дополнительно была обнаружена мутация в гене *RUNX1*.

Все пациенты перед алло-ТГСК получали полихимиотерапию (ПХТ). Высокодозную ПХТ использовали в 3 случаях: блок FLAM (флударабин, цитарабин, митоксантрон) – в 2, блоки ADE, HAM по протоколу AML-BFM-2004 – у пациента с трансформацией в острый лейкоз. Высокодозную ПХТ в комбинации с гипометилирующим агентом 5-азациитидином получили 2 пациента. Одному ребенку была проведена терапия индукции по протоколу AML-BFM-89, дифференцировочная терапия изотретионином, а также малыми дозами цитарабина.

На момент проведения алло-ТГСК у пациента с трансформацией в острый лейкоз клинико-гематологическая ремиссия заболевания не была достигнута (по данным иммунофенотипирования опухолевая популяция 3,2%, моносомия 7-й хромосомы в 100% метафаз). Частичный клинико-гематологический ответ по основному заболеванию (уменьшение гепатоспленомегалии, лейкоцитоза, моноцитоза, уровня бластов в КМ) зафиксирован у 2 пациентов. Прогрессия заболевания в виде нарастания лейкоцитоза, абсолютного моноцитоза, уровня бластов в периферической крови (до 2,5%) и в КМ (до 8,2%) наблюдалась у 1 пациента. Медиана времени от

постановки диагноза до проведения алло-ТГСК составила 6 (4–11) мес.

Алло-ТГСК от родственного гаплоидентичного донора (источник – КМ) была проведена 3 пациентам, от неродственного полностью совместимого донора – 1 пациенту (источник – стволовые клетки периферической крови). Все пациенты имели миелоаблативный режим кондиционирования (РК). В 2 случаях использовали треосульфан-содержащий РК (флударабин 150 мг/м², треосульфан 42 г/м², в том числе тиотепа 8 мг/кг у 1 пациента). Бусульфан-содержащий РК с 2 алкилирующими агентами (бусульфан 12 мг/кг, флударабин 150 мг/м², мелфалан 100 мг/м²) получили 2 пациента. В качестве профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у всех пациентов был использован посттрансплантационный циклофосфамид (ПТЦф) 50 мг/кг на Д+3, Д+4, в 1 случае также была проведена серопротекция тимоглобулином.

Приживление трансплантата с полным донорским химеризмом было достигнуто у всех 4 пациентов: на Д+23, Д+19, Д+21 и Д+32. Персистенция минимальной остаточной болезни методом иммунофенотипирования после алло-ТГСК в размере 0,5% по миелоидному клону сохранялась в 1 случае.

Всем пациентам была выполнена ранняя отмена ИСТ (до Д+100). В качестве профилактики рецидива основного заболевания пациенту №1 проведены 2 курса терапии 5-азациитидином в дозе 75 мг/м². Пациенту №2 с иммуноадаптивной целью на Д+70 и Д+105 выполнены ИДЛ в дозах CD3⁺/кг: 1,0 × 10⁶ и 5,0 × 10⁶. Через 1 мес после второй ИДЛ отмечали развитие индуцированной острой РТПХ печени II степени. Проводилась терапия глюкокортикостероидами, руксолитинибом. Далее определялась хроническая РТПХ средней степени тяжести с поражением слизистой полости рта, кожи I степени, легких I степени без потребности в системной ИСТ.

Ранний (до года после алло-ТГСК) рецидив заболевания в посттрансплантационном периоде зафиксирован у 3 пациентов: на Д+60, Д+221 и Д+210. У пациента №2 развитие позднего рецидива ЮММЛ отмечалось через 14 мес (Д+447) после алло-ТГСК. Уровень донорского химеризма на момент рецидива составил 60–69% у 3 пациентов, 3–9% у пациента №2.

Ретроспективная оценка потери гетерозиготности по генам HLA проводилась с использованием 2 методов с дальнейшим сопоставлением результатов. Был применен метод сравнения 6 высокополиморфных микросателлитных маркеров (STR) D6S265, D6S473, D6S277, D6S105, D6S273 и D6S291, локализованных на 6-й хромосоме, в пробах пациента до трансплантации и в рецидиве. Также использовалась коммерческая тест-система HLA-KMR (GenDx). В основе методики лежит оценка микрохимеризма на основе количественной полимеразной цепной реакции,

нацеленной на не-HLA маркеры (Indel) в сочетании с анализом HLA-специфичных маркеров [13].

Характеристика пациентов отражена в *таблице 1*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После первой алло-ТГСК потеря HLA-гаплотипа методом STR была выявлена в 3 случаях: пациенты №1, 2, 3. Информативный HLA-маркер из системы HLA-KMR был подобран для пациентов №1 и №2. Таргетируемыми аллелями стали A*11 у пациента №1 и A*02 у пациента №2. Обнаружено полное соответствие результатов 2 методик, однако в случае HLA-KMR потеря гетерозиготности HLA у пациента №2 была выявлена в пробе с 90–99% химеризмом до появления признаков активного заболевания.

Циторедуктивная терапия перед проведением повторной алло-ТГСК применялась у 2 детей. Пациенту №1 проводилась комбинированная терапия 5-азациитидином 75 мг/м² в сочетании с ИДЛ в дозах 5 × 10⁵/кг и 1 × 10⁶/кг на Д+157 и Д+169 соответственно. После второй ИДЛ отмечалось развитие отсроченной острой РТПХ III степени (кожи III степени, ЖКТ II степени), выполнена терапия метилпреднизолоном 1 мг/кг, тоцилизумабом, будесонидом, с ответом. На фоне проводимой терапии отмечалась стабилизация заболевания в виде незначительного снижения уровня бластов в КМ (с 12 до 7,8%). Циторедуктивная терапия рецидива с использованием низких доз цитарабина, 5-азациитидина 50 мг/м², венетоклакса 140 мг/м², 6-меркаптопурина использовалась у пациента №2.

Повторная алло-ТГСК со сменой гаплоидентичного донора была выполнена 2 пациентам. В 2 случаях повторная алло-ТГСК проведена без смены донора. Миелоаблативный РК (бусульфан 12 мг/кг, флударабин 150 мг/м²) перед повторной алло-ТГСК был проведен пациентам №1 и №4. Немелоаблативный РК (треосульфат 36 мг/м², флударабин 150 мг/м²) – пациентам №2 и №3. ПТЦф был использован во всех случаях в качестве профилактики острой РТПХ. Приживление трансплантата с полным донорским химеризмом было достигнуто у пациентов №1, 2, 4 на Д+20, Д+25, Д+28 соответственно. У пациента №3, прошедшего повторную алло-ТГСК без смены донора, на Д+28 констатирована трансформация ЮММЛ в ОМЛ: 54% бластов в КМ, в 90% метафаз выявлен патологический клон с моносомией 7-й хромосомы и дополнительным хромосомным материалом на 15q, в одной клетке выявлены также трисомии 15-й и 21-й хромосом, делеция длинного плеча 20-й хромосомы. Химеризм 30–39%. Проводилась отмена ИСТ, выполнена химиотерапия по схеме AI в комбинации с ингибитором BCL2 венетоклаксом, терапия 5-азациитидином в

Таблица 1
Характеристика пациентов

Table 1
Patient characteristics

Параметр Parameter	Пациенты Patients			
	№1	№2	№3	№4
Пол Sex	Женский Female	Женский Female	Мужской Male	Мужской Male
Манифестация ЮММЛ Manifestation of JMML	Острый лейкоз В/миело Acute leukemia B/myeloid	ЮММЛ JMML	ЮММЛ JMML	ЮММЛ JMML
Мутация Mutation	<i>RUNX1, PTPN11</i>	<i>N-RAS</i>	<i>PTNP11</i>	<i>PTNP11</i>
Цитогенетика Cytogenetics	Моносомия 7 Monosomy 7	46,XX	Моносомия 7 Monosomy 7	46,XY
Терапия перед алло-ТГСК Treatment prior to allo-HSCT	ADE, HAM, 5-азацитидин ADE, HAM, 5-azacytidine	Цитарабин, децитабин, меркаптопурин, FLAM, 5-азацитидин, изотретиноин Cytarabine, decitabine, mercaptopurine, FLAM, 5-azacytidine, isotretinoin	Цитарабин, меркаптопурин, FLAM Cytarabine, mercaptopurine, FLAM	Индукция AML-BFM-89, изотретиноин, цитарабин, алло-ТГСК от неродственного 10/10 донора Induction therapy according to the AML-BFM-89 protocol, isotretinoin, cytarabine, allo-HSCT from an unrelated donor 10/10
Статус перед алло-ТГСК Status prior to allo-HSCT	Редукция бластоза Reduction in blast count	Прогрессия Progression	Частичный клинико-гематологический ответ Partial clinical and hematologic response	Частичный клинико-гематологический ответ Partial clinical and hematologic response
PK Conditioning regimen	FluTreoThiotepa	BuFluMel	BuFluMel	FluTreo
Профилактика РТПХ GvHD prophylaxis	ПТЦф, такролимус, MMF PTCy, tacrolimus, MMF	ПТЦф, такролимус, сиролимус PTCy, tacrolimus, sirolimus	ПТЦф, такролимус, эверолимус PTCy, tacrolimus, everolimus	ПТЦф, тимоглобулин, такролимус, MMF PTCy, Thymoglobulin, tacrolimus, MMF
Тип донора Donor type	Гаплоидентичный Haploidentical	Гаплоидентичный Haploidentical	Гаплоидентичный Haploidentical	Неродственный 10/10 Unrelated 10/10
Приживление, дни от алло-ТГСК Engraftment, days after allo-HSCT	+23	+19	+21	+32
Профилактическая терапия после алло-ТГСК Prophylactic therapy after allo-HSCT	5-азацитидин – 2 курса 5-azacytidine – 2 courses	ИДЛ DLI	Нет No	Нет No
РТПХ GvHD	Отсроченная острая РТПХ кожи, ЖКТ III степени Grade III delayed acute GvHD of the skin, GIT	Отсроченная острая РТПХ печени II степени, хроническая РТПХ средней степени Grade II delayed acute GvHD of the liver, moderate chronic GvHD	Нет No	Нет No

Примечание. Здесь и в таблице 2: ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

Note. Here and in table 2: JMML – juvenile myelomonocytic leukemia; allo-HSCT – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; PTCy – post-transplant cyclophosphamide; DLI – donor lymphocyte infusions; GIT – gastrointestinal tract; GvHD – graft-versus-host disease.

дозе 50 мг/м². На Д+100 отмечалось развитие острой РТПХ II степени с поражением кожи II степени, ЖКТ I степени. Несмотря на проводимую комбинированную терапию было констатировано резистентное течение заболевания.

Пациентка №1 в связи с персистенцией минимальной остаточной болезни, развитием цитогенетического рецидива на Д+140 получила 4 курса гипометилирующей терапии (5-азацитидин в дозе 35 мг/м²) с эффектом в виде достижения полной клинико-гематологической, цитогенетической, молекулярно-генетической ремиссии, сохраняющейся на момент последнего контакта.

У пациентки №2 по основному заболеванию была достигнута ремиссия. Однако девочка скончалась в раннем посттрансплантационном периоде

из-за развития тяжелых токсических, инфекционных и иммуноопосредованных осложнений: лимбический энцефалит вирусного генеза (HNV 6), судорожный синдром; острая РТПХ кожи III степени, ЖКТ III степени на Д+77, острая РТПХ легких; цитомегаловирусная болезнь с поражением легких, ЖКТ; облитерирующий бронхолит смешанного генеза, двусторонний пневмоторакс, пневмомедиастинум, подкожная эмфизема в структуре синдрома утечки воздуха.

Пациенту №4 с профилактической целью проводилась иммуноадаптивная терапия донорскими лимфоцитами №3 с Д+80 с интервалом в 1 мес, с эскалацией дозы CD3⁺/кг: 1 × 10⁵, 1 × 10⁶, 1 × 10⁷. Осложнения на фоне ИДЛ – развитие острой РТПХ I степени. Несмотря на проводимую профилактику

рецидива заболевания на Д+200 диагностирован рецидив ЮММЛ. В качестве попытки достижения ремиссии заболевания проведена химиотерапия, блок ADE в комбинации с ИДЛ. CD3⁺/кг – 6,4 × 10⁵. Несмотря на проводимую комбинированную химио- и иммуноадаптивную терапию была зафиксирована прогрессия заболевания.

Таким образом, на момент последнего контакта (01.07.2023) 1 пациент жив и находится в ремиссии заболевания без признаков РТПХ в течение 3 лет после повторной алло-ТГСК со сменой донора. Два пациента умерли из-за прогрессии заболевания после повторной алло-ТГСК без смены донора. Один пациент умер в раннем посттрансплантационном периоде ввиду развития осложнений, ассоциированных с терапией.

После повторной алло-ТГСК потеря гаплотипа методом STR была впервые выявлена у пациента №4, сохранялась у пациента №3. В то же время у пациентки №1, прошедшей алло-ТГСК со сменой донора, при исследовании потери гаплотипа HLA после повторной алло-ТГСК методом количественной полимеразной цепной реакции HLA-KMR отмечалось восстановление гетерозиготности соответствующего аллеля HLA.

Подробное описание результатов терапии рецидива представлено в *таблице 2*.

Таким образом, смена донора при выполнении повторной алло-ТГСК позволила достичь возврата генетической экспрессии HLA, что привело к модуляции реакции «трансплантат против ЮММЛ» под действием 5-азацитина у пациентки №1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

ЮММЛ – клональное миелопролиферативное новообразование кроветворной системы, характеризующееся в большинстве случаев неблагоприятным прогнозом и высокой частотой летальности. Алло-ТГСК является единственным излечивающим методом терапии. Рецидивы остаются основной причиной смерти после алло-ТГСК. В исследовании EUROCORD-SIBMTR 5-летняя вероятность бессобытийной выживаемости для детей, перенесших алло-ТГСК от совместимого сиблинга или неродственного донора, составила 55% и 49% соответственно [4].

По литературным данным, пациенты в возрасте 2 года и старше на момент постановки диагноза, с мутацией *NF1* или соматической мутацией *PTPN11*, высоким профилем метилирования ДНК представляют группу с высоким риском рецидива ЮММЛ после алло-ТГСК (более 50%), что определяет необходимость проведения посттрансплантационной профилактической терапии [1]. Дополнительные мутации ухудшают прогноз у пациентов с мутацией *PTPN11*

[14]. У представленных детей были крайне высокие риски рецидива после алло-ТГСК в виде наличия мутации *PTPN11* у пациентов №№1, 3, 4, отсутствия стойкого ответа на момент алло-ТГСК, возраста на момент постановки диагноза 2 года и старше. Пациентка №1 имела дополнительную мутацию *RUNX1*.

Иммуномодулирование реакции «трансплантат против лейкоза» включает раннюю отмену ИСТ с ИДЛ в монотерапии или комбинации с 5-азацитидином. В отдельных случаях ЮММЛ может быть чувствителен к монотерапии ИДЛ [15]. В одной из работ 21 пациент получил ИДЛ для терапии рецидива ЮММЛ после алло-ТГСК. Из них 6 человек имели ответ на терапию, однако долгосрочные результаты были неблагоприятными ввиду рецидива заболевания и развившихся осложнений [4]. Профилактический подход с использованием ИДЛ и гипометилирующих агентов потенциально эффективен у взрослых пациентов с ОМЛ и миелодиспластическими синдромами, но данных у детей, особенно с ЮММЛ, недостаточно [6, 16].

Иммуноадаптивная терапия ИДЛ была проведена пациентке №1 в качестве терапии рецидива лейкоза, пациентке №2 – в качестве профилактики рецидива, пациенту №4 – в качестве профилактики и терапии рецидива после повторной алло-ТГСК.

О существовании реакции «трансплантат против ЮММЛ» косвенно говорят данные, что хроническая РТПХ может снижать риск рецидива у пациентов с ЮММЛ и улучшать показатели выживаемости [17]. В исследовании EUROCORD-SIBMTR острая РТПХ II–III степени была связана со снижением частоты рецидивов ($p = 0,02$), в то время как острая РТПХ IV степени ассоциировалась с высокой частотой трансплантат-ассоциированной летальности [4].

После ИДЛ у 3 реципиентов отмечалось развитие отсроченной острой РТПХ: III степени с вовлечением кожи и ЖКТ у пациентки №1, II степени с вовлечением печени у пациентки №2, I степени с поражением кожи у пациента №4. Переход в распространенную хроническую форму с поражением кожи, слизистых, легких наблюдался далее у пациентки №2. Пациент №3 развил острую РТПХ кожи, ЖКТ II степени после повторной алло-ТГСК без ИДЛ.

Тем не менее у пациентов №№1, 3, 4 отмечалась прогрессия заболевания на фоне развития острой РТПХ, у пациентки №2 – рецидив на фоне течения хронической РТПХ. Возможным объяснением диссоциации РТПХ и реакции «трансплантат против лейкемии» у этих пациентов может являться факт потери HLA-гаплотипа клетками опухолевой популяции.

Потеря гетерозиготности по генам HLA – проявление геномной нестабильности опухоли, характеризующееся выпадением участка короткого плеча 6-й хромосомы. Среди злокачественных заболеваний

Таблица 2
Результаты терапии рецидива заболевания

Table 2
The results of treatment for relapse

Параметр Parameter	Пациенты Patients			
	№1	№2	№3	№4
Сроки развития рецидива, дни от алло-ТГСК Time to relapse, days after allo-HSCT	+221	+447	+210	+60
Метод определения потери HLA Method for HLA loss detection	STR, HLA-KMR	STR, HLA-KMR	STR	STR
Потеря HLA после первой алло-ТГСК HLA loss after the first allo-HSCT	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
Терапия рецидива Treatment for relapse	5-азацитидин, ИДЛ, повторная алло-ТГСК 5-azacytidine, DLI, second allo-HSCT	Цитарабин, меркаптопурин, 5-азацитидин, венетоклакс, повторная алло-ТГСК Cytarabine, mercaptopurine, 5-azacytidine, venetoclax, second allo-HSCT	Повторная алло-ТГСК Second allo-HSCT	Повторная алло-ТГСК Second allo-HSCT
Смена донора после повторной алло-ТГСК An alternative donor for the second allo-HSCT	Да Yes	Да Yes	Нет No	Нет No
РК при повторной алло-ТГСК Conditioning regimen for the second allo-HSCT	BuFlu	TreoFlu	TreoFlu	BuFlu
Рецидив после повторной алло-ТГСК Relapse after the second allo-HSCT	Да Yes	Нет No	Да Yes	Да Yes
Потеря HLA после повторной алло-ТГСК HLA loss after the second allo-HSCT	Нет No	–	Да Yes	Да Yes
Терапия после повторной алло-ТГСК Treatment after the second allo-HSCT	5-азацитидин – 4 курса 5-azacytidine – 4 courses	Нет No	AI, венетоклакс, 5-азацитидин AI, venetoclax, 5-azacytidine	ADE, ИДЛ ADE, DLI
РТПХ после повторной алло-ТГСК GvHD after the second allo-HSCT	Нет No	Острая РТПХ кожи III степени, ЖКТ III степени, легких III степени Grade III acute GvHD of the skin, GIT, lungs	Острая РТПХ кожи II степени, ЖКТ I степени Grade II acute GvHD of the skin, grade I acute GvHD of the GIT	Острая РТПХ кожи I степени Grade I acute GvHD of the skin
Статус "follow up" "Follow-up" status	Ремиссия, жива Remission, alive	Ремиссия, летальный исход из-за осложнений, связанных с терапией Remission, death due to treatment-related complications	Прогрессия, летальный исход Progression, death	Прогрессия, летальный исход Progression, death

крови данный механизм описан при рецидивах острых лейкозов у взрослых и детей после алло-ТГСК [11, 18, 19]. Потеря донор-специфичного гаплотипа HLA на бластной популяции приводит к необратимой потере экспрессии HLA, невозможности распознавания антигенов опухоли Т-клетками и подавлению реакции «трансплантат против лейкемии». В большинстве случаев потеря гаплотипа HLA происходит при наличии несовместимости по локусам HLA в паре «донор–реципиент». В крупном многоцентровом исследовании, изучавшем встречаемость генетической потери HLA при различных алло-ТГСК, частота потери HLA после гаплоидентичной алло-ТГСК составила 22%, после частично совместимой неродственной алло-ТГСК – 12%, после полностью совместимой неродственной алло-ТГСК – 4% [20]. В представленных нами случаях у 3 пациентов потеря HLA-гаплотипа произошла после алло-ТГСК от гаплоидентичного донора, у 1 ребенка – после повторной алло-ТГСК от полностью совместимого неродственного донора.

При острых лейкозах рецидив с потерей HLA происходит позже, чем классический вариант реци-

дива [21, 22]. В предыдущей работе нашего научного коллектива медиана развития рецидива с потерей HLA у детей с острыми лейкозами составила 8 мес [11]. У представленных пациентов (№№1, 3, 4) рецидив заболевания с потерей HLA был диагностирован через 6–7 мес (Д+221, Д+210, Д+200), у пациента №2 – спустя 15 мес (Д+447) после алло-ТГСК.

В качестве факторов риска, ассоциированных с потерей по генам HLA, могут выступать неблагоприятная цитогенетика, ABO-несовместимость, активное заболевание на момент алло-ТГСК, развитие острой и хронической РТПХ [11, 21, 22]. Биология лейкоза, отсутствие ремиссии перед алло-ТГСК, а также развитие РТПХ могли способствовать клональной эволюции опухоли после алло-ТГСК с последующей потерей HLA-гаплотипа.

Пациенты с рецидивом ЮММЛ после алло-ТГСК имеют крайне неблагоприятный прогноз и 5-летнюю ОВ, не превышающую 10%. Опцию повторной алло-ТГСК следует рассматривать во всех случаях неудач первой алло-ТГСК. В недавнем исследовании Европейской рабочей группы по миелодиспластическому синдрому у детей 68 пациентов получили повторную

алло-ТГСК по случаю рецидива ЮММЛ после первой алло-ТГСК [23]. В 31 (45%) случае повторная алло-ТГСК выполнялась без смены донора. В целом 28 (41%) пациентов были живы после второй алло-ТГСК со средним периодом наблюдения 7,7 года (диапазон 0,4–28,3 года). Пятилетняя ОВ и выживаемость без признаков заболевания составляли 40% (27–53%) и 36% (24–48%) соответственно. Смена донора между 2 алло-ТГСК не влияла на результаты терапии.

Тем не менее в контексте потери донорского гаплотипа HLA смена донора имеет большое значение для восстановления экспрессии HLA и механизма «трансплантат против лейкемии». В случае пациентов №3 и №4 повторная алло-ТГСК была выполнена от того же донора с отсутствием эффекта и трансформацией в ОМЛ в первом случае и прогрессией ЮММЛ во втором случае. В то время как в случае пациентки №1 после повторной алло-ТГСК со сменой на другого гаплоидентичного донора отмечалось восстановление гетерозиготности HLA, подтвержденное лабораторно. Применение длительной посттрансплантационной терапии 5-азациитидином позволило достичь длительной ремиссии, сохраняющейся в течение 3 лет.

Особенностью работы явилась возможность применения 2 методик для анализа потери гетерозиготности HLA. Во-первых, проводилось сравнение 6 STR (D6S265, D6S473, D6S277, D6S105, D6S273, D6S291), локализованных на 6-й хромосоме, в пробах пациента до трансплантации и в рецидиве. Во-вторых, у пациенток №1 и №2 был применен метод HLA-KMR. Результаты полностью совпали, однако при использовании HLA-KMR возможно более раннее определение факта потери гаплотипа HLA при наличии полного донорского химеризма.

Несомненно, наше наблюдение ограничено небольшим количеством случаев, однако дает представление о важности изучения новых факторов для определения вероятности рецидива, ответа на иммунотерапию и показаний к повторной алло-ТГСК. Необходимо продолжение проспективной оценки потери гаплотипа HLA у детей с ЮММЛ после алло-ТГСК для

расширения анализируемой группы и формирования клинических рекомендаций по ведению пациентов с данным заболеванием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье продемонстрировано 4 клинических случая пациентов с рецидивом ЮММЛ после алло-ТГСК, у которых при ретроспективном анализе в момент прогрессии заболевания была выявлена потеря гетерозиготности по генам HLA. Иммуноадаптивная терапия ИДЛ, проводимая у 3 пациентов, вызвала индукцию РТПХ, не потенцируя при этом значимого эффекта реакции «трансплантат против лейкемии». Все пациенты получили повторную алло-ТГСК, однако благоприятный терапевтический результат был достигнут только при смене донора и восстановлении гетерозиготности HLA-гаплотипа (пациентка №1).

Тестирование детей с ЮММЛ на предмет потери гаплотипа HLA необходимо для определения целесообразности проведения иммуноадаптивной терапии и выбора оптимального донора при проведении повторной алло-ТГСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №22-15-00491 (<https://rscf.ru/project/22-15-00491/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Tsvetkova L.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4952-0704>
Osipova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7629-4293>
Evdokimov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3809-421X>
Kozhokar P.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0207>
Rakhmanova Zh.Z. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3386-0942>
Barkhatov I.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8000-3652>
Paina O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7263-4326>
Epifanovskaya O.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8168-6811>
Babenko E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3367-4936>
Ivanova N.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5455-860X>
Kozlov D.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-8205-0094>
Gindina T.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1302-3311>
Semenova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5077-9225>
Zubarovskaya L.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2594-7703>

Литература

- Mayerhofer C., Niemeyer C.M., Flotho C. Current Treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *J Clin Med* 2021; 10 (14): 3084.
- Wintering A., Dvorak C.C., Stieglitz E., Loh M.L. Juvenile myelomonocytic leukemia in the molecular era: a clinician's guide to diagnosis, risk stratification, and treatment. *Blood Adv* 2021; 5 (22): 4783–93.
- Locatelli F., Nöllke P., Zecca M., Korthof E., Lanino E., Peters C., et al.; European Blood and Marrow Transplantation Group. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood* 2005; 105 (1): 410–9.
- Locatelli F., Crotta A., Ruggeri A., Eapen M., Wagner J., Macmillan M.,

- et al. Analysis of risk factors influencing outcomes after cord blood transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia: a EUROCORD, EBMT, EWOG-MDS, CIBMTR study. *Blood* 2013; 122 (12): 2135–41.
5. Yi E.S., Kim S.K., Ju H.Y., Lee J.W., Cho B., Kim B.K., et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia in Korea: a report of the Korean Pediatric Hematology-Oncology Group. *Bone Marrow Transplant* 2023; 58: 20–9.
 6. Guillaume T., Malard F., Magro L., Labopin M., Tabrizi R., Borel C., et al. Prospective phase II study of prophylactic low-dose azacitidine and donor lymphocyte infusions following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2019; 54: 1815–26.
 7. Schmid C., Labopin M., Schaap N., Veelken H., Schleuning M., Stadler M., et al. Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation in acute leukaemia – A matched pair analysis by the Acute Leukaemia Working Party of EBMT. *Br J Haematol* 2019; 184: 782–7.
 8. Yoshimi A., Bader P., Matthes-Martin S., Starý J., Sedlacek P., Duffner U., et al. Donor leukocyte infusion after hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 971–7.
 9. Chang Y.-H., Jou S.-T., Lin D.-T., Lu M.-Y., Lin K.-H. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: case report and literature review. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26 (3): 190–3.
 10. Kozhokar P.V., Paina O.V., Frolova A.S., Rakhmanova Zh.Z., Borovkova A.S., Semenova E.V., et al. Efficiency of second allogeneic HSCT in the children with acute leukemias with relapses after first transplantation. *Cell Ther Transplant* 2019; 8 (4): 33–40.
 11. Цветкова Л.А., Евдокимов А.В., Бархатов И.М., Паина О.В., Епифановская О.С., Бабенко Е.В. и др. Прогностическое значение потери гетерозиготности HLA после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при развитии рецидива острого лейкоза у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (2): 44–53. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-44-53
 12. Wang A., Li W., Zhao F., Zheng Z., Yang T., Wang S., et al. Clinical Characteristics and Outcome Analysis for HLA Loss Patients Following Partially Mismatched Related Donor Transplantation Using HLA Chimerism for Loss of Heterozygosity Analysis by Next-Generation Sequencing. *Cell Transplant* 2022; 31: 09636897221102902.
 13. Ahci M., Toffalori C., Bouwmans E., Crivello P., Brambati C., Pultrone C., et al. A new tool for rapid and reliable diagnosis of HLA loss relapses after HSCT. *Blood* 2017; 130 (10): 1270–3.
 14. Miao Y., Li B., Ding L., Zhu H., Luo C., Wang J., et al. *PTPN11* mutation with additional somatic alteration indicates unfavorable outcome in juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective clinical study from a single center. *Eur J Pediatr* 2020; 179 (3): 463–72.
 15. Worth A., Rao K., Webb D., Chessells J., Passmore J., Veys P. Successful treatment of juvenile myelomonocytic leukemia relapsing after stem cell transplantation using donor lymphocyte infusion. *Blood* 2003; 101 (5): 1713–4.
 16. Tsvetkova L.A., Paina O.V., Rakhmanova Zh.Z., Osipova A.A., Kozhokar P.V., Frolova A.S., et al. Prophylactic and preventive therapy with azacitidine and donor lymphocyte infusions after allo-HSCT in children with acute myeloid leukemia. *Cell Ther Transplant* 2022; 11 (3): 9–10.
 17. Yoshida N., Sakaguchi H., Yabe M., Hasegawa D., Hama A., Hasegawa D., et al. Pediatric myelodysplastic syndrome working group of the Japan society for hematopoietic cell transplantation. Clinical outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the Japan society for hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020; 26: 902–10.
 18. Hirabayashi K., Kurata T., Horiuchi K., Saito S., Shigemura T., Tanaka M., et al. Loss of mismatched HLA on the leukemic blasts of patients with relapsed lymphoid malignancies following bone marrow transplantation from related donors with HLA class II mismatches in the graft versus host direction. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63 (4): 709–11.
 19. Shyr D.C., Zhang B.M., Saini G., Madani N.D., Schultz L.M., Patel S., et al. HLA-haplotype loss after TCRab/CD19-depleted haploidentical HSCT. *Bone Marrow Transplant* 2020; 56 (3): 733–7.
 20. Vago L., Toffalori C., Ahci M., Lange V., Lang K., Todaro S., et al. Incidence of HLA Loss in a Global Multicentric Cohort of Post-Transplantation Relapses: Results from the Hlaloss Collaborative Study. *Blood* 2018; 132: 818.
 21. Muniz P., Kwon M., Carbonell D., Chicano M., Bailen R., Oarbeascoa G., et al. Clinical Utility of the Detection of the Loss of the Mismatched HLA in Relapsed Hematological Patients After Haploidentical Stem Cell Transplantation With High-Dose Cyclophosphamide. *Front Immunol* 2021; 12: 642087.
 22. Crucitti L., Crocchiolo R., Toffalori C., Mazzi B., Greco R., Signori A., et al. Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2015; 29: 1143–52.
 23. Vinci L., Flotho C., Noellke P., Lebrecht D., Masetti R., de Haas V., et al. Second allogeneic stem cell transplantation can rescue a significant proportion of patients with JMML relapsing after first allograft. *Bone Marrow Transplant* 2023; 58: 607–9.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 12.10.2022
Принята к печати 10.07.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-36-42

Профилактика ингибиторной формы тяжелой гемофилии А у детей в Республике Беларусь: 12-летний опыт работы

Е.В. Дмитриев¹, Л.И. Волкова², О.В. Алейникова^{1, 3}, А.В. Любушкин¹

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» Минздрава Республики Беларусь, Республика Беларусь, Минск

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

Контактная информация:
Дмитриев Евгений Вячеславович, врач-гематолог ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: jenyadmitriev24@gmail.com

Поиск мероприятий по снижению риска образования ингибиторов у ранее не леченных пациентов (РНЛП) с тяжелой гемофилией А к вводимому фактору VIII определил актуальность исследования. Цель – определить эффективность профилактики возникновения патологических ингибиторов свертывания у РНЛП (или минимально леченных пациентов) с тяжелой гемофилией А путем введения плазменного концентрата фактора свертывания крови (КФСК) VIII в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед на протяжении 1 года. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). За период с 2010 по 2022 г. тяжелая форма гемофилии А впервые была выявлена у 56 мальчиков. КФСК VIII для остановки кровотечения в режиме «по требованию» получил 21 пациент (1-я группа). В режиме профилактики ингибиторной формы гемофилии КФСК VIII в дозе 25 МЕ/кг массы тела 1 раз/нед на протяжении первых 50 нед лечения получили 35 мальчиков (2-я группа). Применение разрешенного для введения с периода новорожденности плазменного КФСК VIII в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед у РНЛП (или минимально леченных пациентов) способствовало снижению кумулятивной частоты возникновения патологических ингибиторов до $15,9 \pm 7,7\%$ (4 из 35 пациентов) по сравнению с $43,7 \pm 11,8\%$ (8 из 21 пациента) среди детей, получавших гемостатическую терапию в связи с необходимостью остановки кровотечения (log-rank-тест, $p = 0,041$). Таким образом, введение плазменного КФСК VIII в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед на протяжении первых 50 нед сопровождается снижением кумулятивной частоты возникновения ингибиторов ($p = 0,009$) к нему до $15,9 \pm 7,7\%$.

Ключевые слова: дети, профилактика, гемофилия А, ингибиторная форма гемофилии

Дмитриев Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 36–42. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-36-42

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 12.10.2022
Accepted 10.07.2023

The prophylaxis of severe hemophilia A with inhibitors in children in the Republic of Belarus: a 12-year experience

E.V. Dmitriev¹, L.I. Volkova², O.V. Aleinikova^{1, 3}, A.V. Liubushkin¹

¹The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

²The Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education of Ministry of Health of the Republic of Belarus, the Republic of Belarus, Minsk

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

Correspondence:
Evgeny V. Dmitriev, a hematologist at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Belarus
Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk Region, Belarus
E-mail: jenyadmitriev24@gmail.com

The development of inhibitory antibodies against FVIII is the most serious complication associated with the use of FVIII concentrates in hemophilia A patients. There is a need for more research on measures that could reduce the risk of inhibitor formation in previously untreated patients (PUPs) with severe hemophilia A. The purpose of this study was to determine the effectiveness of the prevention of clotting inhibitor development in PUPs (or minimally treated patients) with severe hemophilia A by administering plasma-derived factor VIII concentrate (pdFVIII) at a dose of 25 IU/kg once a week for a year. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (the Republic of Belarus). Between 2010 and 2022, 56 boys were newly diagnosed with severe hemophilia A. Twenty-one of them received pdFVIII as on-demand treatment to stop bleeding (Group 1). Thirty-five boys received pdFVIII at a dose of 25 IU/kg body weight once a week during the first 50 weeks of treatment for the prevention of inhibitor development (Group 2). The administration of pdFVIII at a dose of 25 IU/kg once a week in the PUPs (or minimally treated patients) contributed to a decrease in the cumulative incidence of inhibitors to $15.9 \pm 7.7\%$ (4 out of the 35 patients who had been treated prophylactically) compared with $43.7 \pm 11.8\%$ (8 out of the 21 patients who had received hemostatic therapy to stop bleeding) (log-rank test, $p = 0.041$). Thus, the administration of pdFVIII concentrate at a dose of 25 IU/kg once a week for the first 50 weeks of treatment lead to a decrease ($p = 0.009$) in the cumulative incidence of inhibitors against the administered coagulation factor VIII to $15.9 \pm 7.7\%$.

Key words: children, prevention, hemophilia A, hemophilia A with inhibitors

Dmitriev E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 36–42.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-36-42

Современная концепция оказания медицинской помощи пациентам, страдающим гемофилией, предусматривает профилактическое введение концентратов факторов свертывания крови (КФСК). Исследование CANAL (Concerted Action on Neutralizing Antibodies in severe hemophilia A) показало (S.C. Gouw и соавт. 2007) [1], что регулярная профилактика кровотечений была связана со снижением риска возникновения ингибиторов на 60% (относительный риск 0,4; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,2–0,8) по сравнению с лечением «по требованию» на протяжении первых 50 дней введения КФСК. В пилотном исследовании K. Kurnik и соавт. (2010) [2] показали, что кумулятивная частота возникновения ингибиторов при профилактическом введении рекомбинантного фактора VIII 3-го поколения в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед ранее не леченым пациентам (РНЛП) была значительно ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей стандартную гемостатическую терапию для остановки кровотечения (отношение шансов 0,048; 95% ДИ 0,001–0,372). Авторы [2] предложили эту терапевтическую стратегию для снижения риска образования ингибиторов у пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Режим профилактики образования ингибиторов низкими дозами (25 МЕ/кг 1 раз/нед) рекомбинантного фактора VIII 3-го поколения был протестирован G. Auerswald и соавт. (2015) [3] в клиническом исследовании EPIC Clinical Study, которое было досрочно прекращено из-за чрезмерно частого развития ингибиторов у РНЛП.

В рандомизированном исследовании (SIPPET Survey of Inhibitors in Plasma Product Exposed Toddlers), включавшем РНЛП, получавших лечение рекомбинантными 2–3-го поколения ($n = 126$) или плазменными ($n = 125$) КФСК VIII, определена кумулятивная частота возникновения ингибиторов с плазменным фактором VIII 26,8% (95% ДИ 18,4–35,2) и 44,5% (95% ДИ 34,7–54,3) с рекомбинантным фактором VIII (F. Peyvand и соавт. 2016) [4].

Возможность снижения риска образования ингибиторов у РНЛП с тяжелой гемофилией А путем систематического введения плазменного КФСК VIII в низких дозах (25 МЕ/кг 1 раз/нед) изучена недостаточно. Данное обстоятельство определило цель исследования.

Цель исследования – определить эффективность профилактики возникновения патологических ингибиторов свертывания у РНЛП (или минимально леченных пациентов) с тяжелой гемофилией А путем введения КФСК VIII в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением

ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследование включены 89 мальчиков, состоявших на диспансерном учете ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) в 1998–2022 гг. по поводу тяжелой гемофилии А. Возраст выявления гемофилии, представленный как медиана (10–90-й процентиля), составил 8,0 (0,2–21,0) месяца, базовая активность фактора VIII – 0,7% (0,4–0,95%). Первое введение препаратов свертывания крови VIII выполнено в возрасте 11,0 (0,5–31,0) месяца. Из 89 пациентов ингибиторная форма тяжелой гемофилии А диагностирована у 23 детей.

Профилактика возникновения ингибиторной формы гемофилии А была начата в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) в 2011 г. За период с 2010 по 2022 г. тяжелая форма гемофилии А впервые была выявлена у 56 мальчиков. Этическим комитетом ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) были утверждены разработанные информированное согласие пациента и пилотный протокол профилактики ингибиторной формы гемофилии А. Позднее Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена Инструкция по применению алгоритма профилактики ингибиторной формы гемофилии А (№059-0615 от 04.09.2015). Разделение пациентов по группам осуществляли на основании принятия решения родителей: введение гемостатических доз КФСК VIII для остановки кровотечения в режиме «по требованию» или введение в режиме профилактики ингибиторной формы гемофилии 25 МЕ/кг массы тела 1 раз/нед на протяжении первых 50 нед лечения.

Обязательными условиями старта ранней профилактики ингибиторной формы гемофилии были:

- 1) введение КФСК VIII только для профилактики, а не для остановки кровотечения;
- 2) отсутствие клинических признаков системного воспалительного ответа на инфекцию во время профилактического введения КФСК VIII;
- 3) запрет на выполнение плановых хирургических вмешательств в течение первых 50 дней введения;
- 4) запрет на проведение внутримышечных инъекций, а также на вакцинацию в день профилактического введения фактора VIII в течение первых 100 дней применения;
- 5) начало профилактики ингибиторной формы гемофилии А в возрасте старше 1 года в связи с большей доступностью периферических вен.

При возникновении гемартроза или иного кровотечения на этапе профилактики ингибиторной формы

заболевания пациенту вводили КФСК VIII в дозе 30–50 МЕ/кг 2 раза/сут с учетом ситуации в течение 2–3 дней до исчезновения симптомов кровотечения. После ликвидации острых явлений продолжали введение КФСК в режиме профилактики из расчета 25–30 МЕ/кг 1 раз в 5–6 дней (первое кровотечение) или 1 раз в 3–4 дня (повторное кровотечение). Дни, на протяжении которых были ликвидированы геморрагические проявления, засчитывали в общее число дней введения.

Терапию в режиме «по требованию» получил 21 пациент (1-я группа). Учитывали время введения в неделях от первого дня введения до события, представленного днем лабораторного выявления патологических ингибиторов свертывания в титре 0,6 ВЕ/мл и более, или достижения 50-го дня введения. На протяжении 93,0 (20,0–144,0) нед имело место 48,0 (11,0–51,0) дня введения, что соответствовало 0,47 (0,28–1,44) дня введения в неделю. Ингибиторы были зарегистрированы у 8 (38%) детей.

В режиме профилактики ингибиторной формы гемофилии КФСК VIII получали 35 мальчиков (2-я группа), при этом до начала программы профилактики у 25 пациентов уже было от 1 до 9 (медиана 6) предшествующих дней введения КФСК VIII. Учитывали время введения в неделях от первого дня введения до события, представленного днем лабораторного выявления ингибиторов свертывания в диагностически значимом титре, или достижения 50-го дня введения. На протяжении 47,0 (30,0–85,0) нед имело место 50,0 (48–50,0) дня введения КФСК VIII, что обеспечивало 1,0 (0,45–1,56) дня введения в неделю. Из 35 мальчиков ингибиторы выявлены у 4 (11,4%) пациентов.

До 2009 г. для остановки кровотечения у всех детей с гемофилией А использовали криопреципитат или плазменный КФСК различных производителей. Среди 56 пациентов за период с 2010 по 2022 г. плазменный КФСК VIII (одного производителя), рекомендованный для детей с периода новорожденности, в том числе и для профилактического применения, получал 51 ребенок, 3 пациентам вводили рекомбинантный КФСК VIII 4-го поколения, плазменный концентрат КФСК VIII различных производителей получали 2 детей. Экстренное хирургическое вмешательство ни одному из включенных в исследование пациентов не проводилось.

Для выполнения генетического исследования гена *F8* было получено информированное согласие родителей пациентов, утвержденное этическим комитетом ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). Для генетического исследования использовали венозную кровь,

стабилизированную калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (K_2 ЭДТА). После лизиса эритроцитов из лейкоцитарной суспензии стандартным методом фенол-хлороформной экстракции выделяли геномную ДНК. Инверсию 22-го интрона гена *F8* выявляли по протоколу выполнения инвертированной полимеразной цепной реакции, описанной L.C. Rossetti и соавт. (2005, 2008) [5, 6]. Выявление инверсии 1-го интрона гена *F8* проводили по протоколу R.D. Bagnall и соавт. [7]. Генетический анализ всех экзонов и прилегающих к ним регионов сплайс-сайтов гена *F8* выполняли с применением кастомной панели (Qiagen, Германия), включающей гены *F8*, *F9*, *VWF*, *ADAMTS13*, *F13A1*, *F13B*, методом высокопроизводительного секвенирования на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США). Все клинически значимые изменения подтверждали с помощью капиллярного секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Scientific, США). Среди 21 пациента, получавшего КФСК VIII для остановки кровотечения, нулевые мутации выявлены у 15 детей. Из 35 мальчиков, получавших КФСК VIII в режиме профилактики ингибиторной формы гемофилии, нулевые мутации имели 27 детей.

Характеристика пациентов в выделенных группах представлена в *таблице*.

Коагулологические исследования выполнены на автоматическом коагулометре ACL-9000 фирмы Instrumentation Laboratory (США) с использованием оригинальных реагентов. Коагулологические исследования включали выполнение рутинных хронометрических показателей (активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время, фибриноген), определение активности фактора VIII одностадийным клоттинговым методом. Ингибитор к фактору VIII в единицах Бетезда (БЕ/мл) определяли методом M. Kasper (1968) с поправкой Nijmegen modification [8]. Для исследований на каждом этапе требовалось до 1,5 мл стабилизированной цитратом натрия (1:9) венозной крови, взятой путем пункции периферической вены без наложения жгута.

Статистическую обработку выполняли с использованием программы Statistica 6.0. Результаты представлены как медиана (10–90-й процентиля). Достоверность различия (для $p < 0,05$) в сравниваемых выборках определяли по критерию Манна–Уитни (U-test). Взаимосвязь анализируемых показателей – непараметрическим критерием Gamma (G). Кумулятивную частоту патологических ингибиторов к фактору свертывания VIII рассчитывали методом Каплана–Майера, сравнение результатов проводили с использованием критерия log-rank. При оценке значимости статистических различий использовали

Таблица

Сравнительная характеристика пациентов в выделенных группах в зависимости от режима введения КФСК VIII. Медиана (10-й–90-й процентиля)

Table

Patient characteristics according to the mode of treatment with FVIII concentrate. Median (10th–90th percentiles)

Анализируемый признак Analyzed feature	Режим введения КФСК VIII Mode of treatment with factor VIII concentrate		
	Для остановки кровотечения (1-я группа; n = 21) To stop bleeding (Group 1; n = 21)	Профилактика ингибиторов (2-я группа; n = 35) Inhibitor prevention (Group 2; n = 35)	Достоверность различия (U-тест) Significance of difference (U-test)
Семейный анамнез по гемофилии: Family history of hemophilia: да, n (%) yes, n (%) нет, n no, n	13 (61,9) 8	22 (62,8) 13	p = 0,515
Мутации: Mutations: нулевые, n (%) null, n (%) ненулевые, n non-null, n	15 (71,4) 6	27 (77,1) 8	p = 0,785
Базовая активность фактора VIII, % Baseline FVIII activity, %	0,8 (0,36–1,0)	0,7 (0,36–1,1)	p = 0,165
Возраст выявления гемофилии, месяцы Age at diagnosis of hemophilia, months	3,5 (0,1–15,0)	6,0 (0,5–13,0)	p = 0,469
Возраст первого введения КФСК VIII, месяцы Age at first exposure to FVIII, months	7,5 (0,5–16,0)	10,0 (3,5–16,0)	p = 0,362
Количество дней введения КФСК VIII от первого введения до события The number of exposure days to FVIII, from the first exposure day to an event	48,0 (11,0–51,0)	50,0 (8,0–50,0)	p = 0,873
Время от первого введения до события, нед Time from the first exposure to an event, weeks	93,0 (20,0–144,0)	47,0 (8,0–85,0)	p = 0,007
Количество дней введения в неделю The number of exposure days per week	0,47 (0,28–1,44)	1,0 (0,45–1,56)	p = 0,001
Количество кровотечений за первые 50 дней введения The number of bleeding episodes within the first 50 EDs	8,5 (3,0–14,0)	4,0 (0,0–9,0)	p = 0,001
Ингибиторы свертывания: Clotting inhibitors: да, n (%) yes, n (%) нет, n no, n	8 (38,1) 13	4 (11,4) 31	p = 0,048
Пациенты, получавшие плазменный концентрат: Patients who received plasma-derived FVIII concentrate: одного производителя, n from one manufacturer, n различных производителей, n (%) from different manufacturers, n (%)	19 2 (9,5)	32 3 (8,5)	p = 0,915

Примечание. Событие – выявление патологических ингибиторов 0,6 BE/мл и более или достижение 50-го дня введения.
Note. An event is the detection of FVIII inhibitors at ≥ 0.6 BU/mL or the completion of 50 exposure days.

порог значений для $p < 0,05$. Цензурирование наблюдений произведено на 29.05.2022.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среди 89 мальчиков с тяжелой гемофилией А на протяжении 22 лет патологические ингибиторы к фактору свертывания крови VIII выявлены у 23. Ингибиторная форма гемофилии А у 11 пациентов, родившихся с 1998 по 2009 г., была зарегистрирована с 50-го по 109-й дни введения спустя 12–33 мес после первого применения КФСК VIII. Отсутствие гемостатического эффекта на введение достаточной для остановки кровотечения дозы лекарственного средства было поводом для первого в жизни ребенка обращения в целях регистрации титра ингибиторов 4,0 (1,23–14,0) BE/мл и показателя восстановления 0,1% (0,01–0,16%)/МЕ \times кг⁻¹.

Внедрение с 2010 г. систематического (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100-й дни введения) контроля свертывания крови позволило выявить у 12 пациентов присутствие ингибиторов на протяжении первых 50 дней введения после начала использования КФСК VIII. Кумулятивная частота выявления патологических ингибиторов свертывания на протяжении 22 лет среди 89 пациентов с тяжелой гемофилией А составила $31,0 \pm 5,6\%$ (рисунки 1).

За период с 2010 по 2022 г. тяжелая гемофилия А впервые была выявлена у 56 детей. Всего среди 56 пациентов ингибиторы выявлены у 12 мальчиков в титре 1,44 (0,7–13,0) BE/мл на протяжении первых 21,0 (8,0–52,0) дня введения через 48,0 (12,0–76,0) нед после начала использования КФСК VIII. На момент выявления титр ингибиторов более 10 BE/мл имели 2 пациента, 5–10 BE/мл – 2, в низком титре (1,5–5 BE/мл) ингибитор выявлен у 2 детей; в

6 случаях транзиторный ингибитор, выявленный в титре 0,7–1,4 БЕ/мл, самопроизвольно исчез в течение 4–6 мес на фоне временного прекращения введения КФСК VIII. После восстановления коагуляционного ответа и снижения титра ингибиторов менее 0,6 БЕ/мл 6 пациентов продолжили вторичную профилактику.

КФСК VIII в режиме «по требованию» для остановки кровотечения получил 21 пациент. На протяжении 93,0 (20,0–144,0) нед было зарегистрировано 8,5 (3,0–14,0) случая кровотечений. Для остановки кровотечений КФСК VIII вводили 48,0 (11,0–51,0) дня, что обеспечивало 0,47 (0,28–1,44) дня введения в неделю. Плазменный КФСК VIII одного производителя получали 19 детей, различных производителей – 2 пациента. Не выявлены ингибиторы у 13 (62%) детей. Ингибиторы в диагностически значимом титре (более 0,6 БЕ/мл) зарегистрированы у 8 (38%) пациентов, из них 4 имели транзиторный ингибитор.

Для профилактики ингибиторной формы гемофилии КФСК VIII получали 35 мальчиков. Имело место 50,0 (8,0–50,0) дня введения на протяжении 47,0 (8,0–85,0) нед, что обеспечивало 1,0 (0,45–1,56) дня введения в неделю. Спонтанные кровотечения на этапе профилактики ингибиторной формы гемофилии возникали с частотой 4,0 (0,0–9,0) случая в год, что требовало дополнительного введения КФСК в гемостатической дозе на протяжении 2–3 дней. Плазменный КФСК VIII одного производителя получали 32 пациента, рекомбинантный КФСК VIII 4-го поколения – 3 детей. Из 35 пациентов 2-й группы патологические ингибиторы свертывания не возникли у 31 (89%) ребенка, выявлены у 4 (11%) мальчиков, из них у 2 в виде транзиторных. Среди 4 пациентов, у которых выявлены патологические ингибиторы к

фактору свертывания крови VIII, профилактику ингибиторной формы гемофилии 3 мальчикам проводили плазменным КФСК VIII, 1 ребенку – рекомбинантным КФСК VIII.

Среди 35 РНЛП (или минимально леченных пациентов), получавших КФСК VIII в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед на протяжении первых 50 нед в целях профилактики ингибиторной формы гемофилии, кумулятивная частота появления патологических ингибиторов свертывания составила $15,9 \pm 7,7\%$. Кумулятивная частота ингибиторной формы гемофилии $43,7 \pm 11,8\%$ среди детей, получавших только гемостатическую терапию «по требованию» (рисунки 2), была выше (log-rank-тест, $p = 0,009$). Появление ингибиторов было связано с режимом введения «по требованию» в целях остановки кровотечения ($G = -0,559$; $p = 0,003$). Применение КФСК VIII в гемостатических дозах на протяжении первых 50 дней введения повышало относительный риск ($3,33$; 95% ДИ 1,142–9,732) возникновения патологических ингибиторов к фактору VIII по сравнению с режимом профилактики малыми дозами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным, приведенным многочисленными исследователями [9, 10], частота выявления ингибиторных форм тяжелой гемофилии А среди РНЛП изменяется от 30 до 40%, при использовании плазменных КФСК VIII – 26,8% (95% ДИ 18,4–35,2) и 44,5% (95% ДИ 34,7–54,3) – с рекомбинантным фактором VIII [4]. Среди пациентов с высоким генетическим риском (нулевые мутации) кумулятивная частота возникновения ингибиторов достигает 31,0% (95% ДИ 22,0–41,0) при лечении плазменным фактором VIII.

Рисунок 1

Кумулятивная частота ингибиторной формы тяжелой гемофилии А у детей с 1998 по 2022 г.

Figure 1

The cumulative incidence of inhibitor development in children with severe hemophilia A, from 1998 to 2022

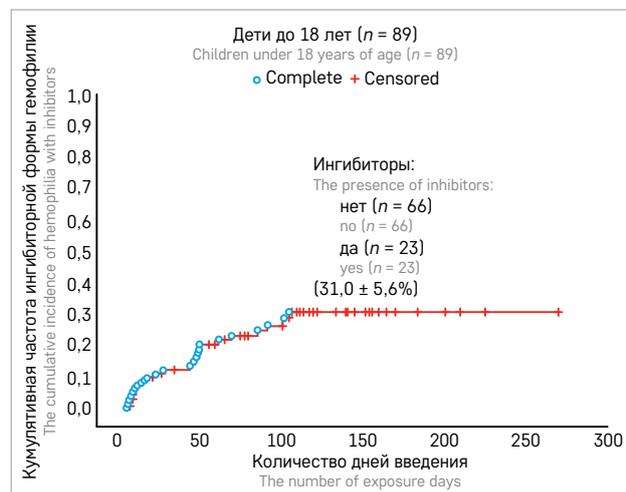
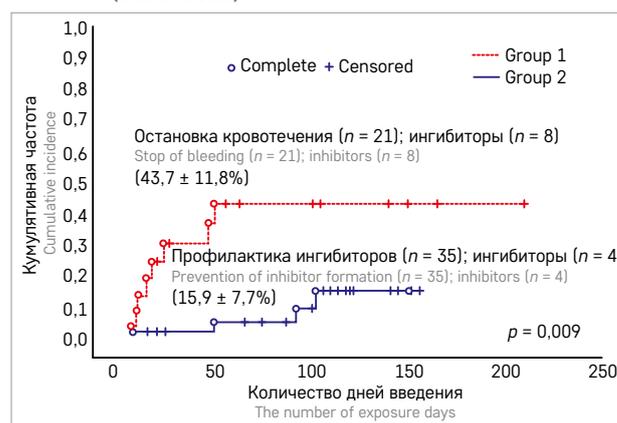


Рисунок 2

Кумулятивная частота возникновения патологических ингибиторов свертывания у детей с гемофилией А в зависимости от режима введения КФСК VIII (2010–2022 гг.)

Figure 2

The cumulative incidence of clotting factor inhibitors in children with hemophilia A according to the mode of treatment with FVIII (2010–2022)



Среди пациентов с низким риском (ненулевые мутации), получавших плазменный КФС VIII, исследователи [10, 11] не выявили ингибиторов.

Авторы краткого сообщения (S. Halimeh и соавт., 2022) [12] для профилактики ингибиторной формы заболевания у 28 РНЛП (или минимально леченных пациентов) применяли плазменный КФС VIII в дозе от 21 МЕ/кг каждые 10 дней до 40 МЕ/кг дважды в неделю в зависимости от склонности к кровотечениям на протяжении первых 50 дней введения. Ограничение использования КФС VIII для остановки кровотечения в режиме «по требованию», по мнению авторов, коррелировало со снижением частоты ингибиторов.

P.S. Maclean и соавт. (2011) [13] в многоцентровом исследовании «случай–контроль», проведенном организацией врачей центров по лечению гемофилии Великобритании (UKHCDO) выявили увеличение шансов появления ингибиторов у РНЛП в случае необходимости проведения гемостатической терапии в течение 5 последовательных дней и более (отношение шансов 2,7; 95% ДИ 1,4–5,4). Шанс (отношение шансов 0,9; 95% ДИ 0,5–1,8) образования ингибиторов в первые 50 дней введения после 3 последовательных дней применения по результатам исследования был значительно ниже.

Согласно нашим результатам, кумулятивная частота возникновения патологических ингибиторов свертывания в целом по группе с 1998 по 2022 г. составила $31,0 \pm 5,6\%$. Введение плазменного КФС VIII в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед РНЛП (или минимально леченым пациентам) способствовало снижению кумулятивной частоты возникновения патологических ингибиторов до $15,9 \pm 7,7\%$ (4 из 35 пациентов) по сравнению с $43,7 \pm 11,8\%$ (8 из 21 пациента) среди детей, получавших гемостатическую терапию в связи с необходимостью остановки кровотечения (log-rank-тест, $p = 0,041$).

Возраст выявления гемофилии, базовая активность фактора VIII, семейный анамнез, частота встречаемости нулевых мутаций, возраст первого введения в анализируемых группах не имели значимых различий (таблица). В обеих группах пациенты получали преимущественно плазменный КФС VIII одного производителя. У пациентов 1-й группы на протяжении от 1,5 года до 3 лет имели место 8,5 (3,0–14,0) геморрагического эпизода. Для остановки крово-

течений понадобилось 48,0 (11,0–51,0) дня введения КФС VIII в гемостатической дозе. Такое же количество дней введения (50,0 (48,0–50,0)) потребовалось за 1,0–1,5 года пациентам, получавшим в целях профилактики ингибиторной формы гемофилии КФС VIII в стартовой дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед. В случае кровотечения на этапе профилактики ингибиторной формы заболевания пациенту вводили КФС VIII в гемостатической дозе с учетом ситуации в течение 2–3 дней до исчезновения симптомов кровотечения. После ликвидации острых явлений продолжали введение КФС VIII в режиме профилактики из расчета 25–30 МЕ/кг 1 раз в 5–6 дней (первое кровотечение) или 1 раз в 3–4 дня (повторное кровотечение). Количество дней введения в неделю в режиме профилактики ингибиторной формы гемофилии было больше (1,0 (0,45–1,56); $p = 0,001$), чем в группе пациентов, получавших КФС VIII в гемостатической дозе по факту кровотечения (0,47 (0,28–1,44)), в связи с более продолжительным временем наблюдения. Выявлена тесная взаимосвязь ($\chi^2 = 5,406$; $p = 0,021$ с поправкой на правдоподобие) между режимом введения КФС VIII «по требованию» и увеличением частоты возникновения ингибиторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение плазменного КФС VIII, разрешенного для применения с периода новорожденности, РНЛП, в том числе и для профилактического применения при тяжелой гемофилии А в дозе 25 МЕ/кг 1 раз/нед на протяжении первых 50 нед введения, сопровождается снижением ($p = 0,009$) кумулятивной частоты возникновения ингибиторов к вводимому фактору свертывания крови VIII до $15,9 \pm 7,7\%$.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Dmitriev E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0233-7718>

Volkova L.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1054-0054>

Aleinikova O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0143-1921>

Liubushkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6127-7404>

Литература

1. Gouw S.C., van der Bom J.G., Marijke van den Berg H. Treatment related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007; 109: 4648–54.
2. Kurnik K., Bidlingmaier C., Engl W., Chehadeh H., Reipert B., Auerswald G. New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemophilia* 2010; 16: 256–62.
3. Auerswald G., Kurnik K., Aledort L.M., Chehadeh H., Loew-Baselli A., Steinitz K., et al.; EPIC Clinical Study Group. The EPIC study: a lesson to learn. *Haemophilia* 2015; 21: 622–8.
4. Peyvandi F., Mannucci P.M., Garagiola I., El-Beshlawy A., Elalfy M., Ramanan V., et al. Randomized trial of Factor VIII and neutralizing antibodies in hemophilia A. *N Engl J Med* 2016; 374: 2054–64.
5. Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by Use of Inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51 (7): 1154–8.
6. Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int 22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 830–6.
7. Bagnall R.D., Waseem N., Green P.M., Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99 (1): 168–74.
8. Hay C.R.M., Broun S., Collins P.W., Keeling D.M., Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Hemophilia Centre Doctors Organisation. *Br J Haematol* 2006; 133: 591–605.
9. Rosendaal F.R., Palla R., Garagiola I., Mannucci P.M., Peyvandi F.; SIPPET Study Group. Genetic risk stratification to reduce inhibitor development in the early treatment of hemophilia A: a SIPPET analysis. *Blood* 2017; 130 (15): 1757–9. DOI: 10.1182/blood-2017-06-791756
10. Keipert C., Drechsel-Bäuerle U., Oberle D., Müller-Olling M., Hilger A. Epidemiological Challenges in Rare Bleeding Disorders: FVIII Inhibitor Incidence in Haemophilia A Patients – A Known Issue of Unknown Origin. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18: 225. DOI: 10.3390/ijerph18010225
11. Liesner R.J., Abraham A., Altisent C., Belletrutti M.J., Carcao M., Carvalho M., et al. Simoctocog Alfa (Nuwiq) in Previously Untreated Patients with Severe Haemophilia A: Final Results of the NuProtect Study. *Thromb Haemost* 2021; 121 (11): 1400–8. DOI: 10.1055/s-0040-1722623
12. Halimeh S., Rott H., Siebert M. et al. An individualized approach to reduce inhibitor risk in pups with severe hemophilia A. EAHAD congress 2022, poster 27. DOI: 10.1111/hae.14479
13. Maclean P.S., Richards M., Williams M., Collins P., Liesner R., Keeling D.M., et al.; Paediatric Working Party of UKHCD0. Treatment related factors and inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2011; 17: 282–7.

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-43-47

Опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных тромбоцитопатий

Е.В. Юшкова¹, Н.А. Подоплелова^{1,2}, Д.В. Федорова¹, А.Л. Хорева¹, А.Ю. Щербина¹, П.А. Жарков¹, М.А. Пантелеев^{1,2}

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

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови является недавно разработанным подходом к дистанционной диагностике различных патологий тромбоцитов, включая *MYH9*-ассоциированную макротромбоцитопению, синдром Бернара–Суллье, тромбастению Гланцмана, синдром серых тромбоцитов, синдром Вискотта–Олдрича и т. д. В данной статье приведен опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных нарушений тромбоцитов в НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Целью исследования было перенести эту относительно трудоемкую методику и внедрить ее в рутинную лабораторную практику. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Ключевые слова: тромбоцитопения, тромбоциты, нарушения тромбоцитов, иммунофлуоресценция

Юшкова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 43–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-43-47

A single-center experience of using immunofluorescence staining of blood smears for the diagnosis of hereditary thrombocytopathies

E.V. Yushkova¹, N.A. Podoplelova^{1,2}, D.V. Fedorova¹, A.L. Khoreva¹, A.Yu. Shcherbina¹, P.A. Zharkov¹, M.A. Panteleev^{1,2}

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

²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow

The method of immunofluorescence staining of blood smears is a recently developed approach to the remote diagnosis of various platelet pathologies including *MYH9* disorders/*MYH9*-related disease, biallelic Bernard–Soulier syndrome, Glanzmann thrombasthenia, gray platelet syndrome, and others. We report here the experience of introducing this method at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia), which is the main national pediatric hematology hospital that provides diagnosis and therapy to children with blood disorders throughout the country. Our study aimed to transfer this relatively labor-intensive and skill-sensitive method and introduce it into routine laboratory practice, and to perform its validation. 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.

Key words: thrombocytopenia, platelets, platelet disorders, immunofluorescence

Yushkova E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 43–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-43-47

Наследственные нарушения тромбоцитов представляют собой гетерогенную и трудную для диагностики группу заболеваний [1–3]. В большинстве случаев кровотечения у пациентов с наследственными нарушениями тромбоцитов не являются жизнеугрожающими. Тем не менее постановка точного диагноза имеет большое значение в связи с пожизненным риском развития тяжелых кровотечений при оперативных вмешательствах, а также актуальностью вопроса о назначении антиагрегантов пожилым пациентам [4, 5]. В случае наследственной тромбоцитопении точная диагностика обычно избавляет пациента от диагноза иммунной тромбоцитопении и неоправданного применения иммунодепрессантов и спленэктомии.

К нарушениям функции тромбоцитов могут приводить различные дефекты, включая изменения экспрессии поверхностных рецепторов, нарушения внутриклеточных сигнальных путей тромбоцитов, дефицит α - и/или плотных гранул и нарушения их секреции. Для большинства заболеваний из группы тромбоцитопатий постановка диагноза – сложный процесс, требующий большого количества лабораторных тестов с последующей комплексной оценкой их результатов [6]. При этом соответствующие диагностические тесты могут быть выполнены только в некоторых специализированных центрах. Также стоит отметить, что для большинства тестов необходима только свежая кровь. Все это приводит к необ-

© 2023 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 27.12.2022
Принята к печати 28.04.2023

Контактная информация:

Подоплелова Надежда Александровна, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: podoplelovan@yandex.ru

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 27.12.2022

Accepted 28.04.2023

Correspondence:

Nadezhda A. Podoplelova, PhD, a leading researcher at the Laboratory of Cell Hemostasis and Thrombosis of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: podoplelovan@yandex.ru

ходимости пациентов совершать дальние поездки для проведения соответствующих обследований и постановки точного диагноза. Кроме того, для большинства тестов требуется значительный объем крови, недопустимый для педиатрических пациентов. При этом большое число нарушений, связанных с дефектами компонентов тромбоцитов (такими как адгезивные рецепторы и цитоскелетные белки) могут быть обнаружены при помощи иммунофлуоресцентного анализа мазка крови [7]. Для этой методики требуется минимальное количество крови, что позволяет применять ее у маленьких детей. А подготовленные и высушенные образцы могут храниться и пересылаться на значительные расстояния, что позволяет использовать данный метод для подтверждения диагнозов пациентов из труднодоступных регионов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Пациенты

В работу включены деперсонифицированные результаты лабораторных исследований, выполненных у пациентов в возрасте от 9 до 40 лет, получавших стационарную или амбулаторную помощь в условиях НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Исследование носило ретроспективный характер. Всего включены 13 пациентов с установленным диагнозом наследственной тромбоцитопении или тромбоцитопатии.

Диагноз считался подтвержденным, если: а) была идентифицирована генетическая мутация либо б) лабораторный тест, например проточная цитометрия, подтверждал диагноз, т. е. выраженное снижение или отсутствие комплексов гликопротеина (GP) I β X или GP IIb/IIIa (IIb β 3) при синдроме Бернара–Сулье и тромбоцитопении Гланцмана соответственно, и в) симптомы, наблюдаемые у пациентов, соответствовали клинической картине заболевания, описанной в литературе.

Приготовление мазков крови

Первый этап подготовки образцов заключался в приготовлении стандартных высушенных на воздухе мазков крови (10–20 мазков для каждого пациента). Для приготовления использовали свежую венозную кровь, взятую в вакуумные пробирки с цитратом натрия 3,2% или 3,8%. Перед фиксацией образцы хранили только при комнатной температуре в сухом месте не менее суток и не более 2 нед. Важно отметить, что ни в коем случае нельзя помещать образцы крови или мазки в холодильник, так как это приводит к деполимеризации периферического кольца из тубулиновых микротрубочек [8].

Фиксация и хранение образцов

Высушенные мазки крови фиксировали холодным ацетоном в течение 2 мин. Затем образцы высушивали на воздухе до полного испарения ацетона. Зафиксированные и высушенные образцы можно использовать для иммунофлуоресцентной окраски сразу либо хранить длительное время (несколько недель) при –20°C.

Иммунофлуоресцентное окрашивание мазков крови

На образцах гидрофобным карандашом обводили регион интереса (диаметр около 1 см). Затем зафиксированные образцы инкубировали с 10% козьей сывороткой в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере, удаляли со стекол излишки жидкости и инкубировали образцы с первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Для каждого антитела подбирали оптимальное разведение (таблица 1). После инкубации с первичными антителами образцы промывали 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером Дульбекко (pH = 7,2), удаляли со стекол излишки жидкости и инкубировали образцы со вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере в темноте. Для вторичных антител использовали разведение 1:400. После инкубации со вторичными антителами образцы промывали 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером Дульбекко (pH = 7,2), удаляли со стекол излишки жидкости, наносили флуоресцентную среду для заключения, закрывали покровным стеклом. Готовые образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа, экспрессию интересующего белка оценивали по сравнению с нормальным контролем, окрашенным параллельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании опубликованных в литературе данных [7] была подобрана панель антител для диагностики наиболее распространенных наследственных нарушений тромбоцитов. Для выбранных антител были подобраны концентрации, позволяющие визуализировать различные структуры тромбоцитов (плазматическая мембрана, плотные гранулы, лизосомы, α -гранулы, цитоскелет). Используемые в панели маркеры приведены в таблице 1.

Полученная в результате панель антител была протестирована на образцах здоровых добровольцев и пациентов с известными диагнозами, установленными по клинической картине и генетическому анализу. Список патологий с указанием числа пациентов и обнаруженными характерными морфологическими особенностями клеток в мазке крови приведен в таблице 2. Выявленные в результате анализа

Таблица 1

Антитела, применяемые для иммунофлуоресцентной окраски мазков крови больных с подозрением на наследственную тромбоцитопению

Table 1

Antibodies used for immunofluorescence staining of blood smears from patients with suspected inherited thrombocytopenia

Параметр Parameter	Антиген Antigen	Клон антител Antibody clone	Производитель Manufacturer	Используемое разведение антител Antibody dilution
Мембранные белки Membrane proteins	GP1bIX	FMC-25	Bio-Rad	1:500
	GP1IbIIIa	P2	Becton Coulter	1:2000
	CD34 ^a	4H11	eBioscience	1:100
Маркеры α-гранул α-granule markers	Фактор фон Виллебранда Von Willebrand factor	Поликлональные антитела Polyclonal antibodies	Dako	1:2000
	P-селектин (CD62p) P-selectin (CD62p)	AK-4	BD Bioscience	1:800
Маркеры плотных гранул Dense granule markers	LAMP2	H4B4	Santa Cruz	1:20
	CD 63	H5C6	BD Bioscience	1:2500
Маркеры лизосом Lysosome markers	LAMP1	H5G11	Santa Cruz	1:20
Цитоскелетные белки Cytoskeletal proteins	Тяжелая цепь немышечного миозина (NMMIIa) Non-muscle myosin heavy chain (NMMIIa)	Поликлональные антитела Polyclonal antibodies	Sigma Aldrich	1:10 000
	β ₁ -тубулин β ₁ -tubulin	TUB 2.1	Sigma Aldrich	1:100
	Филамин ^b Filamin ^b	PM6/317	Santa Cruz	1:4000
	α-актинин ^b α-actinin ^b	H-2	Santa Cruz	1:100

Примечание. ^a – не входит в основную панель, используется у пациентов с подозрением на дефицит α-гранул для дифференциации синдрома серых тромбоцитов и *GF11B*-мутации; ^b – не входит в основную панель, используется у пациентов с подозрением на нарушения цитоскелета, в частности филамин А-ассоциированную тромбоцитопению.

Note. ^a – not included in the main panel, used in patients with suspected α-granule deficiency to differentiate gray platelet syndrome and *GF11B* mutation; ^b – not included in the main panel, used in patients with suspected cytoskeletal disorders, in particular filamin-A related thrombocytopenia.

Таблица 2

Характерные морфологические особенности тромбоцитов пациентов

Table 2

Typical morphological features of the patients' platelets

Патология Disorder	Число проанализированных пациентов The number of patients analyzed	Характерные морфологические особенности Typical morphological features
Нарушения мембранных GP Platelet membrane glycoprotein abnormalities		
Синдром Бернара–Сюлье Bernard–Soulier syndrome	2	Увеличенные в размерах тромбоциты со сниженным или полностью отсутствующим сигналом по GP1bIX Enlarged platelets with reduced or absent GP1bIX signaling
Тромбастения Гланцмана Glanzmann thrombasthenia	2	Тромбоциты имеют нормальные размеры и уменьшенный или полностью отсутствующий сигнал по GP1IbIIIa Normal-sized platelets with reduced or absent GP1IbIIIa signaling
Нарушения цитоскелета Diseases of the cytoskeleton		
Синдром Вискотта–Олдрича Wiskott–Aldrich syndrome	2	Уменьшенные в размерах тромбоциты. Периферическое тубулиновое кольцо деформировано и перекручено в форме восьмерки Decreased platelet size. The peripheral tubulin ring is deformed and twisted into a figure of eight
<i>MYH9</i> -макротромбоцитопения <i>MYH9</i> -macrothrombocytopenia	2	Увеличенные в размерах тромбоциты, в гранулоцитах при окрашивании тяжелой цепи немышечного миозина наблюдаются тельца включения The platelets are enlarged. Non-muscle myosin heavy chain staining shows inclusion bodies
Дефициты α-гранул α-granule deficiencies		
Синдром серых тромбоцитов (мутация в <i>NBEAL2</i>) Gray platelet syndrome (mutation in the <i>NBEAL2</i> gene)	2	Тромбоциты нормального размера. Снижен или полностью отсутствует сигнал от α-гранулярных белков (фактор фон Виллебранда, P-селектин). Отсутствует окрашивание по CD34 Normal-sized platelets. The signal from α-granular proteins (von Willebrand factor, P-selectin) is reduced or absent. No CD34 staining
<i>GF11b</i>	2	Тромбоциты нормального размера. Снижен или полностью отсутствует сигнал от α-гранулярных белков (фактор фон Виллебранда, P-селектин). Есть окрашивание по CD34 The platelets are of normal size. The signal from α-granular proteins (von Willebrand factor, P-selectin) is reduced or absent. CD34 staining is seen
Синдром Якобсена Jacobsen syndrome	1	Тромбоциты нормального размера. Снижен или полностью отсутствует сигнал от α-гранулярных белков (фактор фон Виллебранда, P-селектин). Отсутствует сигнал от маркеров плотных гранул (LAMP2, CD63) The platelets are of normal size. The signal from α-granular proteins (von Willebrand factor, P-selectin) is reduced or absent. No signal from dense granule markers (LAMP2, CD63)

морфологические особенности тромбоцитов приведены на *рисунке*.

Выявленные в результате анализа образцов пациентов и здоровых добровольцев морфологические особенности тромбоцитов полностью согласуются с описанными в литературе, в том числе в работах профессора Грайнахера [7]. А именно: пациенты с синдромом Бернара–Суллье имеют увеличенные в размерах тромбоциты со сниженным или полностью отсутствующим сигналом по GPIbIX [9]. Тромбоциты пациентов с тромбастенией Гланцмана имеют нормальные размеры и уменьшенный или полностью отсутствующий сигнал по GPIIb/IIIa [10, 11]. Для *MUN9*-ассоциированной макротромбоцитопении характерны увеличенные в размерах тромбоциты, в гранулоцитах при окрашивании тяжелой цепи мышечного

миозина наблюдаются тельца включения [12, 13]. Тромбоциты пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича, напротив, уменьшены в размерах, наблюдаются деформированные кольца β_1 -тубулина (периферическое кольцо изогнуто в форме восьмерки) [14]. Перечисленные морфологические особенности тромбоцитов приведены на *рисунке*.

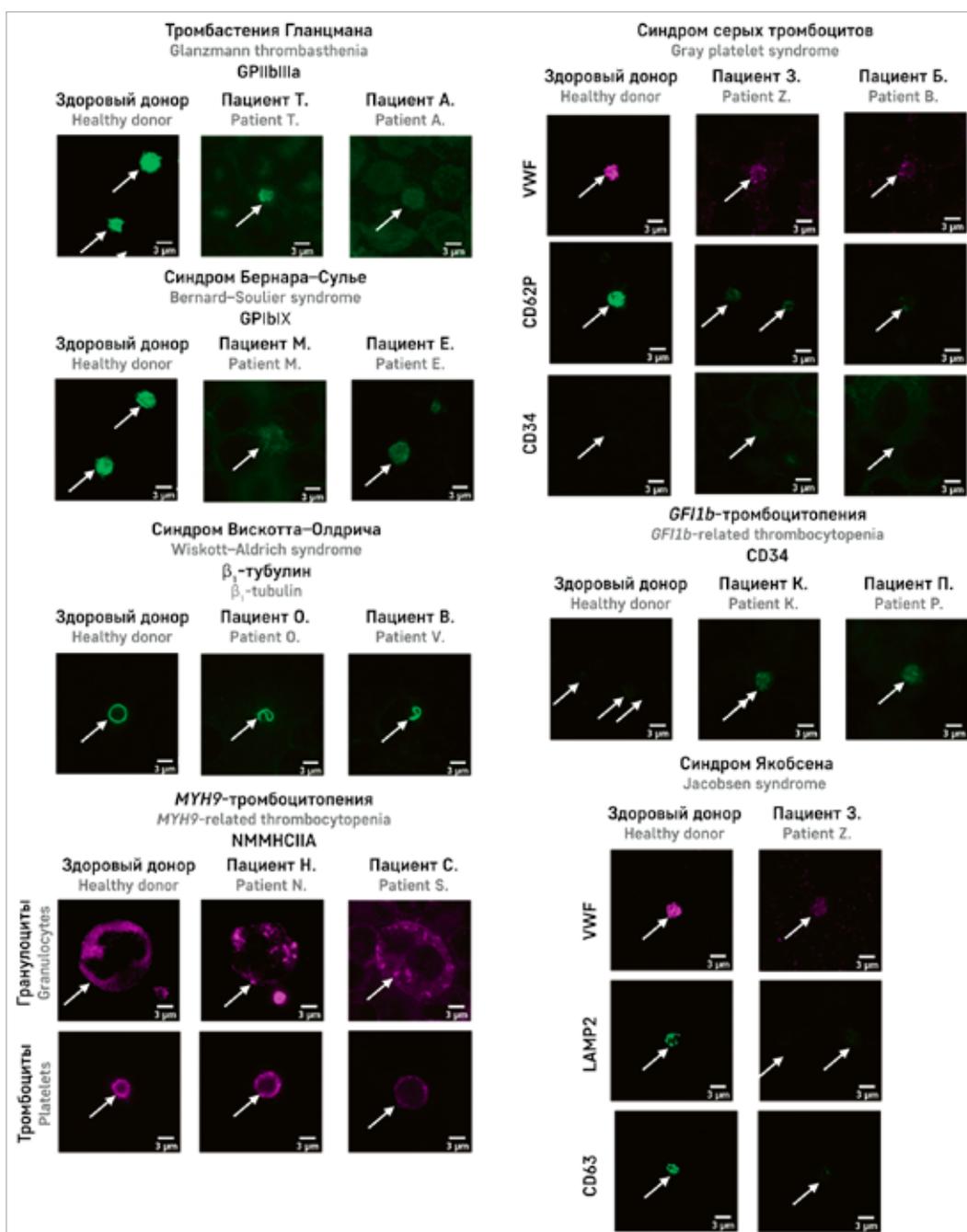
Таким образом, оптимизированный метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови позволяет идентифицировать наиболее распространенные наследственные патологии тромбоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имунофлуоресцентный анализ мазков крови позволяет охарактеризовать морфологические

Рисунок
Морфологические особенности тромбоцитов у пациентов с наследственными нарушениями тромбоцитов. Типичные микрофотографии для здоровых добровольцев и пациентов. Зеленым и пурпурным цветом показана флуоресценция соответствующих антител. Стрелками выделены тромбоциты. Масштаб горизонтальных отрезков, нанесенных на микрофотографии, соответствует 3 мкм

Figure
The morphological features of platelets in patients with inherited platelet disorders. Typical photomicrographs of healthy volunteers and patients. Green and magenta colors show the fluorescence of the corresponding antibodies. The arrows indicate platelets. Horizontal scale bars: 3 μ m



особенности тромбоцитов, что, в свою очередь, позволяет использовать его для диагностики наследственных нарушений тромбоцитов. Данный метод требует минимального количества крови (не более 100 мкл), поэтому его можно применять у пациентов детского возраста. Даже при тяжелой тромбоцитопении в мазке крови присутствует необходимое количество тромбоцитов, позволяющее провести анализ. Необходимо отметить, что, несмотря на простоту преаналитических этапов, для непосредственного окрашивания и анализа образцов требуются значительный опыт и специализированное оборудование, из-за чего аналитические этапы целесообразнее делать в крупных медицинских центрах. Однако, благодаря простоте транспортировки образцов, это не вызовет существенных сложностей.

Стоит учитывать, что в настоящее время метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови имеет ряд ограничений. В частности, пока он не подходит для диагностики ряда наследственных нарушений тромбоцитов, например макротромбоцитопении *ACTN1*, *ANKRD26*-связанной и *ETV6*-связанной тромбоцитопений. Кроме того, пока не выявлены достоверные маркеры, позволяющие определить приобретенные нарушения тромбоцитов, например иммунную тромбоцитопению. Однако эта область быстро развивается и идентифицируются новые диагностические маркеры. В литературе встречаются данные об экспрессии тяжелой цепи немышечного миозина IIB в тромбоцитах при наличии мутации *RUNX1* или *FLI1* [15]. Таким образом,

стоит ожидать, что в ближайшее время увеличится количество тромбоцитарных нарушений, диагностируемых с использованием иммунофлуоресцентного анализа мазков крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы был оптимизирован и апробирован метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови, позволяющий диагностировать наиболее распространенные наследственные нарушения тромбоцитов независимо от возраста пациента и его удаленности от крупных медицинских центров. Метод был апробирован на образцах крови пациентов с известными диагнозами. Выявленные особенности тромбоцитов совпадали с описанными в литературе.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-6271.2021.1.4 и гранта Российского научного фонда 23-45-10039.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Podoplelova N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8013-1112>

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

Khoreva A.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8697-4206>

Shcherbina A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3113-4939>

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

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

- Gresele P.; Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13 (2): 314–22. DOI: 10.1111/jth.12792
- Watson S.P., Lowe G.C., Lordkipanidzé M., Morgan N.V.; GAPP consortium. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2013; 11 Suppl 1: 351–63. DOI: 10.1111/jth.12199
- Федорова Д.В., Жарков П.А., Плясунова С.А., Серёгина Е.А., Игнатова А.А. Диагностика врожденных нарушений функций тромбоцитов: современное состояние вопроса. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2017; 16 (1): 83–95. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-83-95
- Boender J., Kruij M.J.H.A., Leebeek F.W.G. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2016; 14 (8): 1507–16. DOI: 10.1111/jth.13368
- Bolton-Maggs P.H.B., Chalmers E.A., Collins P.W., Harrison P., Kitchen S., Liesner R.J., et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135 (5): 603–33. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06343.x
- Пономаренко Е.А., Игнатова А.А., Федорова Д.В., Жарков П.А., Пантелеев М.А. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 18 (3): 112–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119
- Greinacher A., Pecci A., Kunishima S., Althaus K., Nurden P., Balduini C.L., et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2017; 15 (7): 1511–21. DOI: 10.1111/jth.13729
- Bender M., Stritt S., Nurden P., Van Eeuwijk J.M.M., Zieger B., Kentouche K., et al. Megakaryocyte-specific Profilin1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott–Aldrich syndrome-like platelet defect. *Nat Commun* 2014; 5: 4746. DOI: 10.1038/ncomms5746
- López J.A., Andrews R.K., Afshar-Kharghan V., Berndt M.C. Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 1998; 91: 4397–418.
- Кумскова М.А., Дёмина И.А., Подоплелова Н.А., Баландина А.Н., Серёгина Е.А., Бондар Е.В. и др. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015; 14: 17–24.
- George J., Caen J., Nurden A. Glanzmann's Thrombasthenia: The Spectrum of Clinical Disease. *Blood* 1990; 75: 1383–95.
- Savoia A., De Rocco D., Panza E., Bozzi V., Scandellari R., Loffredo G., et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9-RD): Neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost* 2010; 103 (4): 826–32. DOI: 10.1160/TH09-08-0593
- Kunishima S., Matsushita T., Kojima T., Sako M., Kimura F., Jo E.K., et al. Immunofluorescence Analysis of Neutrophil Nonmuscle Myosin Heavy Chain-A in MYH9 Disorders: Association of Subcellular Localization with MYH9 Mutations. *Lab Invest* 2003; 83 (1): 115–22. DOI: 10.1097/01.lab.0000050960.48774.17
- Мартынов 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 гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (1): 100–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107
- Antony-Debré I., Bluteau D., Itzykson R., Baccini V., Renneville A., Boehlen F., et al. MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood* 2012; 120: 2719–22.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 28.02.2023
Принята к печати 28.03.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-48-57

Молекулярно-генетическая диагностика в группе пациентов с гемофилией А в Республике Беларусь: 12 новых аллельных вариантов в гене *F8*

А.В. Любушкин^{1,2}, И.Е. Гурьянова^{1,2}, Е.В. Дмитриев¹, В.Р. Вертелко¹, Е.А. Полякова^{1,2}, Л.И. Волкова³, О.В. Алейникова⁴

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, Минск

³ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» Минздрава Республики Беларусь, Республика Беларусь, Минск

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Контактная информация:

Любушкин Александр Владимирович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: aleksandr.liubushkin@gmail.com

Гемофилия А является наиболее распространенным тяжелым нарушением свертываемости крови, обусловленным различными генетическими нарушениями в гене *F8*, приводящими к дефициту VIII фактора свертывания крови. Гемофилия А характеризуется крайне высокой гетерогенностью в отношении генетических нарушений. Степень тяжести гемофилии А варьирует в зависимости от типа нарушения в гене *F8*. Идентифицировано и описано более 3000 уникальных вариантов гена *F8*, ассоциированных с фенотипом гемофилии А. При этом примерно 30% генетических нарушений возникают *de novo*. Цель настоящего исследования – определить спектр генетических нарушений в гене *F8* у детей и подростков с гемофилией А в Республике Беларусь. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследование были включены 98 пациентов с клиническим диагнозом гемофилии А, находившихся на обследовании и лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В зависимости от тяжести заболевания распределение пациентов было следующим: 82 пациента – с тяжелой, 3 – со среднетяжелой и 13 – с легкой формой гемофилии А. У 20 (20,4%) пациентов в анамнезе имелись данные о развитии ингибиторов к VIII фактору свертывания крови. Материалом исследования послужила венозная кровь. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из полученной суспензии лейкоцитов. Всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А выполняли предскрининг на наличие инверсии 22-го и 1-го интронов гена *F8* методами инвертированной и мультиплексной полимеразной цепной реакции соответственно. Секвенирование кодирующих областей гена *F8* проводили методом высокопроизводительного секвенирования. Все клинически значимые изменения в нуклеотидной последовательности подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру. В результате проведенного исследования генетические нарушения в гене *F8* были обнаружены у 99% ($n = 97$) пациентов с гемофилией А. Инверсии 22-го и 1-го интронов гена *F8* были детектированы у 45,1% ($n = 37$) и 1,2% ($n = 1$) пациентов с тяжелой формой гемофилии А соответственно. У 2 пациентов выявлен аномальный паттерн инверсии 1-го интрона, ранее не описанный в литературе. Высокопроизводительное секвенирование выявило 48 различных генетических нарушений в гене *F8* у 57 пациентов. Из 48 обнаруженных генетических нарушений 11 ранее не были описаны в литературных источниках.

Ключевые слова: гемофилия А, ген *F8*, генетические нарушения, молекулярно-генетическая диагностика

Любушкин А.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 48–57. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-48-57

Molecular genetic diagnosis in the group of hemophilia A patients in Belarus: 12 new allelic variants in the *F8* gene

A.V. Liubushkin^{1,2}, I.E. Guryanova^{1,2}, E.V. Dmitriev¹, V.R. Vertelko¹, E.A. Polyakova^{1,2}, L.I. Volkova³, O.V. Aleinikova⁴

¹The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

²Belarusian State Medical University, the Republic of Belarus, Minsk

³The Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education of Ministry of Health of the Republic of Belarus, the Republic of Belarus, Minsk

⁴The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 28.02.2023

Accepted 28.03.2023

Hemophilia A is the most common severe bleeding disorder caused by various genetic changes in the *F8* gene, leading to coagulation factor VIII deficiency. Hemophilia A is characterized by high heterogeneity of genetic defects. The severity of hemophilia A varies depending on the type of genetic defects in the *F8* gene. More than 3000 unique variants of the *F8* gene are associated with the hemophilia A. Approximately 30% of genetic defects occur *de novo*. The aim of this study is to determine the spectrum of genetic defects in the *F8* gene in children with hemophilia A in Belarus. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (the Republic of Belarus). The study included 98 patients with hemophilia A, who had been treated or followed up at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (the Republic of Belarus). Patients were categorized into 3 groups based on the severity of their disease: severe ($n = 82$), moderate ($n = 3$), and mild ($n = 13$). Twenty (20.4%) patients had a history of inhibitors to factor VIII. For our study, we used venous blood samples. Genomic DNA was isolated from leukocyte suspension (obtained from the whole blood samples) using phenol-chloroform extraction. All severe hemophilia A patients were prescreened for intron 22 and 1 inversions in the *F8* gene using inverse and multiplex polymerase chain reaction assays, respectively. Sequencing of *F8* coding regions was carried out by next generation sequencing. All clinically relevant variants were confirmed by Sanger sequencing. Genetic testing revealed that 99% of the patients with hemophilia A ($n = 97$) had pathogenic variants in the *F8* gene. Intron 22 and intron 1 inversion mutations within the *F8* gene were detected in 45.1% ($n = 37$) and 1.2% ($n = 1$) patients with severe hemophilia A, respectively. Two patients had an abnormal pattern of intron 1 inversion, not previously described in the literature. A total of 48 different variants in the *F8* gene were detected in 57 patients using next generation sequencing. Eleven of the 48 genetic variants identified have not been previously reported.

Key words: hemophilia A, *F8* gene, genetic defects, molecular genetic diagnosis

Liubushkin A.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 48–57.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-48-57

Среди коагулопатий наследственного генеза наиболее распространенным тяжелым заболеванием является гемофилия А с X-сцепленным рецессивным типом наследования [1–3]. Частота встречаемости гемофилии А оценивается около 1 случая на 5000 новорожденных мальчиков [4]. Причиной гемофилии А являются различные дефекты гена *F8* (OMIM #306700), приводящие к дефициту VIII фактора свертывания крови (FVIII). В зависимости от остаточной активности FVIII (FVIII:C) гемофилию А подразделяют на тяжелую (FVIII:C < 1%), среднетяжелую (FVIII:C 1–5%) и легкую (FVIII:C > 5%) формы [3, 4]. Пациенты с наследственной формой гемофилии А матери, как правило, являются гетерозиготными носителями 1 мутантного аллеля гена *F8*, ввиду чего также имеют пониженные уровни FVIII в крови, приводящие к легкому фенотипу гемофилии А [3].

Ген *F8* картирован на теломерном конце X-хромосомы в локусе Xq28, состоит из 25 интронов и 26 экзонов и имеет протяженность 186 тыс. пар нуклеотидов. Кодированная часть включает 2332 аминокислотных остатка, формирующих структурные домены A1–A2–B–A3–C1–C2 [2, 4]. Домены A1–A2–B входят в состав тяжелой цепи, а домены A3–C1–C2 – в состав легкой цепи зрелого FVIII [5]. Высокое содержание GC-оснований делает ген *F8* подверженным к возникновению спонтанных аллельных вариантов в момент дробления зиготы, поэтому примерно в 30% случаев гемофилия А возникает в результате нарушений *de novo* [2].

Известно более 3000 уникальных вариантов в гене *F8*, ассоциированных с фенотипом гемофилии А [6], включающих миссенс- и нонсенс-мутации, мутации в сайтах сплайсинга, небольшие вставки и/или делеции, а также крупные перестройки [7]. На основании этого нарушения, приводящие к гемофилии А, характеризуются высокой гетерогенностью [4]. Наиболее частыми дефектами в гене *F8* у пациентов с тяжелой формой гемофилии А явля-

ются инверсии 1-го (IVS1) и 22-го (IVS22) интронов, которые встречаются у 1–5% и 45–50% пациентов соответственно [8]. Обе инверсии происходят в результате внутрихромосомной рекомбинации между гомологичными участками в 1-м или 22-м интроне и их внегенными копиями, расположенными дистальнее гена *F8* [9, 10]. У остальных пациентов с тяжелой формой гемофилии А выявляются различные однонуклеотидные варианты (single nucleotide variants). Легкие и среднетяжелые формы гемофилии А в основном обусловлены различными миссенс-мутациями в гене *F8* [8]. Миссенс-мутации являются наиболее распространенным типом нарушений среди пациентов с гемофилией А и встречаются во многих локусах гена *F8*. В зависимости от аминокислотной замены и конкретной локализации миссенс-мутации могут приводить к легкой, среднетяжелой и тяжелой формам гемофилии А [11].

Пациенты с тяжелой формой гемофилии А с различными нарушениями в гене *F8* демонстрируют значительную гетерогенность клинических проявлений. В литературе описаны различные клинические фенотипы среди пациентов с идентичными мутациями в гене *F8* [1]. Хотя делеции и инверсии ассоциированы с тяжелой формой гемофилии А, миссенс-мутации и некоторые небольшие делеции или инсерции в кодирующих областях гена *F8* могут приводить к смягчению фенотипа гемофилии А [1]. Более мягкий фенотип в таких случаях может быть обусловлен наличием остаточной активности FVIII в результате эндогенного восстановления рамки считывания из-за ошибок ДНК-полимеразы во время репликации ДНК/транскрипции РНК при небольших делециях или инсерциях, локализованных в регионах Poly-A – участках кодирующей последовательности гена *F8* из нескольких повторяющихся друг за другом аденинов [1, 12].

По способности продуцировать белок FVIII все мутации в гене *F8* классифицируют на 2 группы – нулевые и ненулевые [1]. К нулевым мутациям

Correspondence:

Aliaksandr V. Liubushkin,
junior researcher of Laboratory of Molecular
Genetic Research, Scientific Department,
Belarusian Research Center for Pediatric
Oncology, Hematology
and Immunology, Belarus
Address: 43 Frunzenskaya St.,
Borovlyany 223053, Minsk District, Belarus
E-mail: aleksandr.liubushkin@gmail.com

относят IVS22/IVS1, большие делеции, нонсенс-мутации, небольшие делеции/инсерции вне регионов Poly-A, мутации, затрагивающие регионы сайтов сплайсинга, при наличии которых синтез белка FVIII полностью отсутствует, т. е. активность FVIII не достигает пороговой чувствительности метода. К ненулевым мутациям относят миссенс-мутации, мутации в неконсервативных участках сайтов сплайсинга, небольшие делеции/инсерции внутри регионов Poly-A, при которых из-за синтеза некоторого количества белка определяется сниженная активность FVIII [1]. Таким образом, молекулярно-генетические исследования гена *F8* способствуют не только точной диагностике гемофилии А, но и позволяют в большинстве случаев устанавливать генотип-фенотипическую взаимосвязь у пациентов с данной патологией [8].

Образование аллоантител (ингибиторов) к FVIII является наиболее серьезным осложнением при применении заместительной терапии для лечения гемофилии А [13]. Процесс образования ингибиторов при использовании заместительной терапии концентратов FVIII имеет мультифакториальную природу и включает как генетические, так и негенетические факторы риска [7, 14]. Основным признанным генетическим фактором риска развития ингибиторов является тип нарушения в гене *F8* [14], т. е. нулевые мутации ассоциируют с высоким риском развития ингибиторов, а ненулевые мутации – с низким риском развития ингибиторов [7, 15].

Цель настоящего исследования – определить спектр генетических нарушений в гене *F8* у детей и подростков с гемофилией А в Республике Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследование включены 98 пациентов с клиническим диагнозом гемофилии А, находившихся на обследовании и лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). Пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с показателем FVIII:C: 1-я группа – FVIII:C < 1% (пациенты с тяжелой формой гемофилии А, $n = 82$); 2-я группа – FVIII:C 1–5% (пациенты со среднетяжелой формой гемофилии А, $n = 3$); 3-я группа – FVIII:C > 5% (пациенты с легкой формой гемофилии А, $n = 13$). У 20,4% ($n = 20$) пациентов с тяжелой формой гемофилии А в анамнезе имелись данные о развитии ингибиторов к FVIII. Возраст пациентов на момент исследования

варьировал от 1 месяца до 18 лет, медиана составила 7,5 года. От всех родителей пациентов и/или их официальных представителей было получено информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования.

Коагуляционную активность FVIII определяли одностадийным клоттинговым методом на автоматическом коагулометрическом анализаторе ACL-9000 с использованием оригинальной тест-системы (Instrumental laboratory). Материалом для исследования служила венозная кровь, полученная с помощью вакутайнера путем пункции периферической вены без наложения жгута и стабилизированная 3,2% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Ингибитор к FVIII в единицах Бетезда (БЕ/мл) определяли методом М. Kasperg (1968) с поправкой Nijmegen [16]. Материалом для молекулярно-генетического исследования служила венозная кровь, стабилизированная антикоагулянтом K_2 ЭДТА. Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из цельной суспензии лейкоцитов. При выполнении молекулярно-генетических исследований использовали комплексный подход, включающий методы инвертированной и мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метод высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS).

Всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А выполняли исследования по определению IVS22 гена *F8* методом инвертированной ПЦР с использованием протокола, описанного в статье Rosseti и соавт. [17], и добавленными модификациями [18]. При отсутствии IVS22 гена *F8* в образцах далее выполняли исследования по определению IVS1 методом мультиплексной ПЦР в соответствии с публикацией Vagnall и соавт. [19]. ПЦР проводили с использованием амплификатора C1000 (BioRad, США). Детекцию продуктов амплификации осуществляли путем электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей визуализацией результатов в системе гель-документирования (BioRad Gel Doc XR+, США). Интерпретацию результатов ПЦР проводили на основании размера фрагментов контролей и образцов пациентов, обнаруженных методом электрофореза в агарозном геле. В качестве положительных контролей использовали образцы ДНК пациентов с ранее диагностированной IVS22/IVS1 и образцы ДНК гетерозиготных носителей.

Далее всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А, в образцах которых методами мультиплексной и инвертированной ПЦР IVS22/IVS1 гена *F8* не было выявлено, как и всем пациентам с легкой и среднетяжелой формами гемофилии А, проводили исследование всех экзонов и прилегающих к ним регионов сплайс-сайтов гена *F8*. Определение нуклеотидных последовательностей выполняли методом

NGS на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США) с применением кастомной панели QIAseq Targeted DNA Custom Panels 333525 (LOT CDHS-33342Z-384, Qiagen, Германия), включающей зонды для амплификации регионов генов *F8*, *F9*, *VWF*, *ADAMTS13*, *F13A1* и *F13B*. Обработку полученных данных проводили с использованием автоматизированного программного обеспечения QIAseq Targeted Sequencing Data Analysis Portal (Qiagen, Германия). Выявленные олигонуклеотидные отличия от референсной последовательности (GRCh37) сравнивали с публичными базами данных ENSEMBL, gnomAD (the Genome Aggregation Database), EAHAD *F8* database и CHAMP (CDC Haemophilia A Mutation Project).

Не описанные однонуклеотидные варианты анализировали с применением онлайн-программ предсказания патогенности PolyPhen2, MutationTaster, SIFT, Mutation assessor, PROVEAN, Varsome, ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). Для поиска отличий и оценки влияния мутации на размер белка, заряд и уровень гидрофобности, определения взаимодействий, нарушенных изменением аминокислоты, и анализа структурных доменов, в которых расположена измененная аминокислота, использовали онлайн-программу HOPE.

Наличие клинически значимых изменений в нуклеотидной последовательности подтверждали методом автоматического секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США) с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Анализ результатов секвенирования по Сэнгеру проводили с помощью специализированных программных обеспечений Sequencing Analysis 7.0 (Applied Biosystems, США) и BioEdit (Bioedit Ltd, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное нами исследование, направленное на определение и анализ спектра нарушений в гене *F8*, приводящих к развитию гемофилии А, показало, что у 99% ($n = 97$) пациентов с гемофилией А выявлены патогенетические нарушения. У 41,2% ($n = 40$) пациентов нарушения в гене *F8* были выявлены методами на основе ПЦР (IVS22/IVS1), а у 58,8% ($n = 57$) пациентов – методом NGS. Все аллельные варианты в гене *F8* идентифицированы в гемизиготном состоянии. У 1 пациента с легкой формой гемофилии А патогенных генетических вариантов в гене *F8*, а также в генах *F9*, *VWF*, *ADAMTS13*, *F13A1* и *F13B* не обнаружено.

Среди детей с тяжелой формой гемофилии А в нашей выборке IVS22 гена *F8* выявлена у 45,1% ($n = 37$) пациентов, у 32 из которых определена IVS22

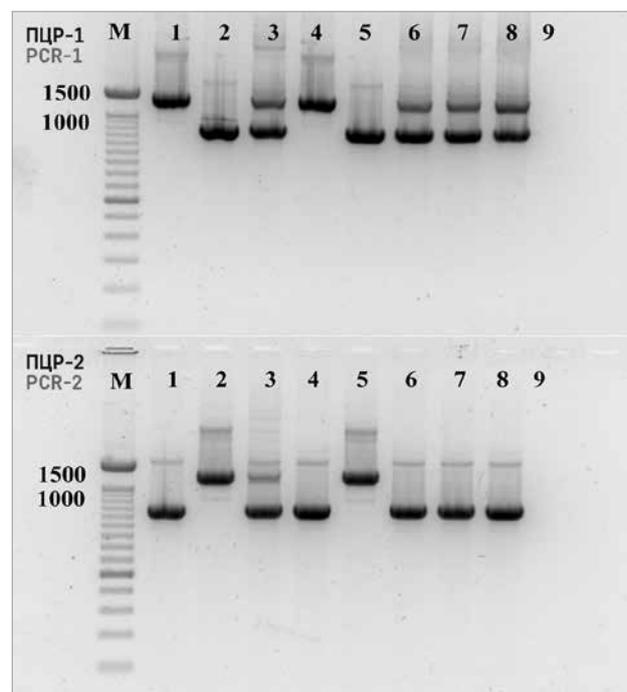
1-го типа, а у 5 – 2-го типа. Среди оставшихся пациентов с тяжелой формой гемофилии А, у которых методом инвертированной ПЦР не выявлена IVS22 ($n = 45$), в 1 случае определена IVS1 гена *F8*. Кроме того, у 2 родственных пациентов в ходе исследования обнаружен аномальный паттерн IVS1, который не соответствовал генотипу мутантного или дикого типа (рисунки 1). Таким образом, у пациентов с тяжелой формой гемофилии А IVS22 и IVS1 гена *F8* выявлены в 45,1% и 1,2% случаев соответственно. Согласно международным исследованиям, у пациентов с тяжелой формой гемофилии А IVS22 гена *F8* является наиболее часто встречаемой генетической перестройкой [4, 9, 10]. Полученные результаты

Рисунок 1

Электрофореграмма результатов детекции IVS1 ПЦР-1 характеризует состояние региона *int1h-1* в интроне 1 гена *F8*; ПЦР-2 – состояние экстрагенного региона *int1h-2*. При отсутствии IVS1 в ПЦР-1 и ПЦР-2 детектируются фрагменты размерами 1500 и 1000 пар нуклеотидов соответственно. При наличии IVS1 в ПЦР-1 и ПЦР-2 детектируются фрагменты размером 1000 и 1500 пар нуклеотидов соответственно. М – маркер молекулярных масс; 1 – контрольный образец дикого типа; 2 – контрольный образец гемизиготной IVS1; 3 – контрольный образец с гетерозиготной IVS1; 4 – пациент, у которого отсутствует IVS1; 5 – пациент с IVS1; 6, 7 – пациенты с аномальным паттерном IVS1; 8 – мать пациентов с аномальным паттерном IVS1; 9 – отрицательный контроль

Figure 1

An electropherogram showing the results of IVS-1 detection. PCR, polymerase chain reaction. PCR-1 characterizes the state of the *int1h-1* region in intron 1 of the *F8* gene; PCR-2 characterizes the state of the *int1h-2* extragenic region. In the absence of IVS1, 1500 bp and 1000 bp fragments are detected in PCR-1 and PCR-2, respectively. In the presence of IVS1, 1000 bp and 1500 bp fragments are detected in PCR-1 and PCR-2, respectively. M – a molecular weight marker; 1 – a wild-type control sample; 2 – a control sample of hemizygous IVS1; 3 – a control sample with heterozygous IVS1; 4 – a patient without IVS1; 5 – a patient with IVS1; 6, 7 – patients with an abnormal pattern of IVS1; 8 – the mother of the patients with an abnormal IVS1 pattern; 9 – a negative control



сопоставимы с данными из публикаций о генетических нарушениях у пациентов с тяжелой формой гемофилии А [20–25].

Аномальный паттерн IVS1, обнаруженный в ходе нашего исследования, показал, что в ПЦР-1 визуализировалось 2 фрагмента длиной 1000 пар нуклеотидов (соответствующий рекомбинации между int1h-1 и int1h-2 и указывающий на инверсию) и 1500 пар нуклеотидов (соответствующий участку int1h-1 дикого типа и характеризующий отсутствие инверсии), а в ПЦР-2 (для детекции региона int1h-2) наблюдался только 1 фрагмент длиной 1000 пар нуклеотидов (соответствующий участку int1h-2 дикого типа и характеризующий отсутствие инверсии). В литературе описано всего несколько случаев детектирования аномального паттерна IVS1 в гене *F8* [26–29], но ни один из них не соответствует паттерну IVS1, обнаруженному в нашем исследовании. Необычные паттерны IVS1, часто обнаруживаемые со сложными перестройками – дупликациями/делециями, могут быть обусловлены возможным присутствием дополнительных копий региона int1h или сегментных дупликаций гена *F8* [30]. Для полной характеристики патогенетического механизма обнаруженного паттерна IVS1 гена *F8* необходимо проведение дополнительного исследования, направленного на выявление крупных перестроек в гене *F8* методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции (multiplex ligation-dependent probe amplification).

По результатам выполненного NGS-исследования у 60 пациентов с гемофилией А (3 пациента со среднетяжелой формой, 13 – с легкой формой, 44 – с тяжелой формой (42 пациента без IVS22 и IVS1 и 2 – с аномальным паттерном IVS1)) выявлено 48 уникальных патогенетических нарушений

в 57 случаях. В зависимости от типа нарушения в гене *F8* распределились следующим образом: 47,9% ($n = 23$) миссенс-мутаций, 12,5% ($n = 6$) нонсенс-мутаций, 10,4% ($n = 5$) дефектов в сплайс-сайтах, 12,5% ($n = 6$) небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания, 12,5% ($n = 6$) небольших дупликаций, приводящих к сдвигу рамки считывания, 2,1% ($n = 1$) крупных делеций и 2,1% ($n = 1$) синонимичных замен (сайлент-мутации). В 14-м экзоне гена *F8* выявлено 27,1% ($n = 13$) аллельных вариантов, что может быть обусловлено его сравнительно большим размером по отношению к остальным экзонам. У 2 пациентов с аномальным паттерном IVS1, а также у 1 пациента с легкой формой гемофилии А по результатам NGS-исследования отличий от референсной нуклеотидной последовательности гена *F8* не обнаружено. Все результаты молекулярно-генетических исследований представлены в *таблице*.

В ходе исследования выявлена синонимичная однонуклеотидная замена с.1569G>T, не приводящая к замене одной аминокислоты на другую (p.Leu523Leu), у пациента с фенотипом легкой формы гемофилии А. Выявленная замена с.1569G>T, по данным литературных источников, приводит к появлению нового акцепторного сайта сплайсинга, что обуславливает делецию первых 36 нуклеотидов 11-го экзона гена *F8*. В результате этого синтезируется белок FVIII, в котором отсутствуют 12 аминокислот 6-го экзона гена *F8* [31–33]. В базе данных CHAMP замена с.1569G>T описана у пациентов как с легкой, так и со среднетяжелой формой гемофилии А [34]. Для верификации выявленной методом NGS гемизиготной делеции 6-го экзона проведено капиллярное секвенирование по Сэнгеру участка кодирующей ДНК гена *F8* (*рисунок 2*).

Таблица
Спектр выявленных нарушений в гене *F8*

Table
The spectrum of mutations identified in the *F8* gene

Тип нарушения Type of mutation	Число пациентов Number of patients	Выявленная мутация Identified mutation		Экзон Exon	Домен FVIII Domain of FVIII	Ингибиторы к FVIII Inhibitors to FVIII	Мутация в регионе Poly-A Poly(A) site mutation	Форма гемофилии А Severity of hemophilia A	Источник Source
		по кодирующей последовательности by coding sequence	по белку by protein						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IVS22	37	–	–	–	–	Да/нет Yes/no	–	Тяжелая Severe	Lakich et al. (1993), Nature Genetics
IVS1	1	–	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Brinke et al. (1996), Human Molecular Genetics
IVS1-аномальный паттерн IVS1 abnormal pattern	2	–	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Silent	1	с.1569G>T	p.Leu523Leu	11	A2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Diamond et al. (1992), Human Mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Missense	1	c.330G>A	p.Met110Ile	3	A1	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Johnsen et al. (2017), Blood Advances
	1	c.398A>G	p.Tyr133Cys	4	A1	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Tavassoli et al. (1998), Human Mutation
	1	c.1433A>G	p.Asp478Gly	9	A2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	HAMSTERS (The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site)
	1	c.1834C>T	p.Arg612Cys	12	A2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Diamond et al. (1992), Human Mutation
	1	*c.3746T>G	p.Leu1249Arg	14	B	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Наши данные Our data
	1	c.5414A>G	p.Tyr1805Cys	16	A3	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Reitter et al. (2010), Thrombosis & Haemostasis
	1	*c.5879G>A	p.Arg1960Gln	18	A3	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Morichika et al. (1997), British Journal of Haematology
	1	c.6533G>A	p.Arg2178His	23	C1	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Schwaab et al. (1995), British Journal of Haematology
	1	c.6785T>C	p.Val2262Ala	25	C2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Margaglione et al. (2008), Haematologica
	1	c.6968G>A	p.Arg2323His	26	C2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Schwaab et al. (1995), British Journal of Haematology
	2	c.1171C>T	p.Arg391Cys	8	A1	Нет No	Нет No	Легкая/ среднетяжелая Mild/ moderate	Shima et al. (1989), Blood
	1	c.902G>A	p.Arg301His	7	A1	Нет No	Нет No	Среднетяжелая Moderate	Higuchi et al. (1991), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	1	c.1172G>A	p.Arg391His	8	a1	Нет No	Нет No	Среднетяжелая Moderate	Arai et al. (1989), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	2	c.224A>T	p.Asp75Val	2	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Johnsen et al. (2017), Blood Advances
	3	c.523T>G	p.Tyr175Asp	4	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	2	c.1042T>C	p.Cys348Arg	8	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Kogan et al. (1990), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	1	c.1662T>A	p.Ser554Arg	11	A2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.1681G>C	p.Asp561His	11	A2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Waseem et al. (1999), Methods in Molecular Medicine
	1	c.2056A>C	p.Thr686Pro	13	A2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.5159C>A	p.Ala1720Asp	14	A3	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	David et al. (2006), Haematologica
1	c.6046C>T	p.Arg2016Trp	19	A3	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Liu et al. (2002), Thrombosis & Haemostasis	
1	c.6544C>T	p.Arg2182Cys	23	C1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Reiner et al. (1992), Thrombosis Research	
1	c.6560G>A	p.Gly2187Asp	23	C1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Santacroce et al. (2008), Journal of Human Genetics	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nonsense	3	c.1063C>T	p.Arg355Ter	8	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Gitschier et al. (1988), Blood
	1	c.1804C>T	p.Arg602Ter	12	A2	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	Pattinson et al. (1990), Blood
	1	c.2440C>T	p.Arg814Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Pattinson et al. (1990), Blood
	1	c.2933C>A	p.Ser978Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Gouw et al. (2011), Haemophilia
	1	c.4241C>G	p.Ser1414Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.4935G>A	p.Trp1645Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Waseem et al. (1999), Methods in Molecular Medicine
Splicing	1	c.388+1G>A	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Rydz et al. (2013), American Journal of Hematology
	1	c.5220-2A>G	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Vinciguerra et al. (2006), Thrombosis & Haemostasis
	1	c.6430-2A>G	–	–	–	Да Yes	–	Тяжелая Severe	Repešé et al. (2007), Thrombosis & Haemostasis
	1	c.6723+1G>A	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Casana et al. (2008), Haematologica
	1	c.771_787+3 dupAAACA GGTCTCT GCCAGGTA	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Frameshift	1	c.4379dupA	p.Asn1460Lys fs 1461Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Легкая Mild	Higuchi et al. (1991) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	2	c.2945dupA	p.Asn982Lys fs990Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Naylor et al. (1993), Human Molecular Genetics
	2	c.3637dupA	p.Ile1213Asn fs1240Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Pieneman et al. (1995), British Journal of Haematology
	2	c.4379delA	p.Asn1460Ile fs 1464Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Naylor et al. (1993), Human Molecular Genetics
	1	c.4825dupA	p.Thr1609Asn fs Ter4	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Lin et al. (1993), Genomics
	1	c.4843delG	p.Asp1615Ile fs 1620Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.5078delA	p.Lys1693Arg fs 1730Ter	14	a3	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Kim et al. (2012), Haemophilia
	1	c.5517dupA	p.His1840Thr fs 1846Ter	16	A3	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Frameshift	1	c.6070dupC	p.His2024Pro fs 2039Ter	19	A3	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	Ahmed et al. (2005), Haematologica
	1	6196delG	p.Ala2066Pro fs2098Ter	21	C1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.6737_6738 delAA	p.Lys2246Arg fs 2383Ter	25	C2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.6981_6989 delTCA CCCCA	p.Ile2327Met fs 2349Ter	26	C2	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Large deletion	1	Del 6 exon	–	6	–	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Pavlova et al. (2008), Haemophilia

Примечание. * – генетические нарушения, идентифицированные у одного пациента.
Note. * – genetic defects identified in one patient.

Делеции всего 6-го экзона или затрагивающие последовательность 6-го экзона описаны в публичных базах данных EAHAD F8 database и CHAMP [34, 35].

Однонуклеотидная дупликация c.4379dupA, приводящая к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона (p.Asn1460Lys fs

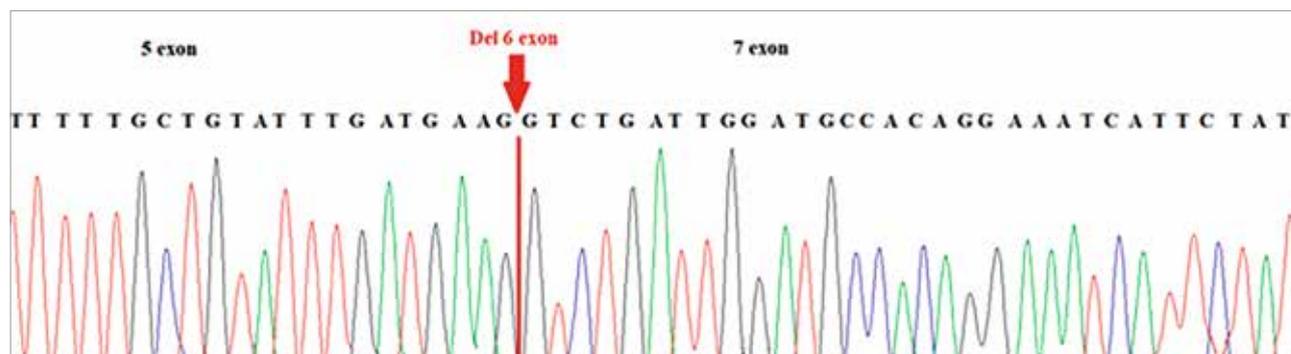
1461Ter), выявлена у пациента с легкой формой гемофилии А. Такой тип мутации, как правило, приводит к синтезу укороченного, функционально неактивного белка и ассоциирован с тяжелым течением заболевания. Однако легкий фенотип гемофилии А у данного пациента, возможно, может быть обусловлен локализацией выявленной дупликации

Рисунок 2

Результаты капиллярного секвенирования участка кодирующей ДНК пациента с делецией 6-го экзона гена *F8*

Figure 2

The results of Sanger sequencing of the cDNA region of a patient with an exon 6 deletion of the *F8* gene



в регионе Poly-A 14-го экзона. Для дупликаций/делеций в таких регионах кодирующей последовательности характерно восстановление рамки считывания за счет «проскальзывания» РНК-полимеразы [36]. Данный случай показывает, что при изучении взаимосвязей между генетическими предпосылками и клинической картиной гемофилии А необходимо оценивать не только тип нарушения, но и его локализацию.

Из 47 уникальных аллельных вариантов, идентифицированных в гене *F8* в нашем исследовании, 11 ранее не были описаны в литературных источниках и публичных базах данных EAHAD F8 database и CHAMP.

Нонсенс-мутации

В исследуемой когорте пациентов выявлена 1 не описанная в литературе однонуклеотидная замена в 14-м экзоне – с.4241C>G, приводящая к преждевременному появлению стоп-кодона (p.Ser1414Ter), в результате чего синтезируется укороченный, неполноценный белок с нарушенной функциональной активностью.

Мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания

Выявлены 4 ранее не описанные делеции и 1 однонуклеотидная дупликация: 14-й экзон – с.4843delG, p.Asp1615Ile fs 1620Ter; 21-й экзон – 6196delG, p.Ala2066Pro fs2098Ter; 25-й экзон – с.6737_6738delAA, p. Lys2246Arg fs 2383Ter; 26-й экзон – с.6981_6989delTCACCCCA, p.Ile2327Met fs 2349Ter и 16-й экзон – с.5517dupA, p.His1840Thr fs 1846Ter, которые приводят к сдвигу рамки считывания и впоследствии к образованию преждевременного стоп-кодона. Результатом такого рода мутаций является синтез укороченного, неполноценного белка.

Миссенс-мутации

Идентифицированы ранее не описанные 4 миссенс-мутации: с.523T>G, p.Tyr175Asp;

с.1662T>A, p.Ser554Arg; с.2056A>C, p.Thr686Pro; с.3746T>G, p.Leu1249Arg. Все обнаруженные однонуклеотидные замены не зарегистрированы в контрольной выборке популяционной базы gnomAD. Анализ с помощью онлайн-программы HOPE выявил структурные различия между референсной аминокислотой и возникшей в результате генетического нарушения, которые могут повлиять на функциональную активность белка.

Нуклеотидный вариант с.523T>G, обнаруженный у 3 родственных пациентов с фенотипом тяжелой гемофилии А, приводит к замене тирозина на аспарат в 175-м кодоне (p.Tyr175Asp). Компьютерные программы предсказания патогенности (PolyPhen2, MutationTaster, SHIFT, Mutation assessor, PROVEAN) расценивают выявленный вариант как вероятно патогенный. Кроме того, в базах данных EAHAD F8 database и CHAMP ранее описаны другие замены в 175-м кодоне, ассоциированные с различным фенотипом гемофилии А (с.523T>C, p.Tyr175His; с.524A>C, p.Tyr175Ser; с.524A>G, p.Tyr175Cys). По классификации ACMG выявленный вариант является вероятно патогенным.

Выявленная однонуклеотидная замена с.1662T>A приводит к ранее описанной в CHAMP аминокислотной замене Ser554Arg, но является следствием нуклеотидной замены, не встречающейся ранее. Компьютерные программы предсказания патогенности (PolyPhen2, MutationTaster, SHIFT, Mutation assessor, PROVEAN) расценивают выявленный вариант как вероятно патогенный. В базах данных EAHAD F8 database и CHAMP также описаны другие однонуклеотидные замены в 554-м кодоне, приводящие к гемофилии А (с.1660A>G, p.Ser554Gly; с.1660A>T, p.Ser554Cys; с.1661G>A, p.Ser554Asn). По классификации ACMG выявленный вариант относится к патогенным.

Замена с.2056A>C приводит к замене треонина на пролин в 686-м кодоне (p.Thr686Pro). При оценке выявленного варианта компьютерными программами

предсказания патогенности были получены неоднозначные результаты: PolyPhen2, SHIFT, Mutation assessor, PROVEAN расценивают выявленный вариант как вероятно патогенный, MutationTaster – как полиморфизм. В базах данных EAHAD F8 database и CHAMP также описаны другие однонуклеотидные замены в 686-м кодоне, ассоциированные с фенотипом гемофилии А (с.2057C>A, р.Thr686Lys; с.2057C>G, р.Thr686Arg). По классификации ACMG выявленный вариант является вероятно патогенным.

Ранее не описанная однонуклеотидная замена с.3746T>G, приводящая к замене лейцина на аргинин в 1249-м кодоне, выявлена у пациента с фенотипом легкой гемофилии А вместе с ранее описанной в базах данных EAHAD F8 database и CHAMP заменой с.5879G>A, приводящей к фенотипу гемофилии А. При оценке выявленного варианта с.3746T>G компьютерными программами предсказания патогенности были получены неоднозначные результаты: MutationTaster, Mutation assessor, PROVEAN расценивают вариант как непатогенный, а SHIFT и PolyPhen2 – как вероятно патогенный. Классификация ACMG относит выявленную замену к вариантам неопределенного клинического значения.

Мутации в регионе сайтов сплайсинга

Обнаружена дупликация в регионе, затрагивающем сайт-сплайсинга 6-го экзона, – с.771_787+3du рAAACAGGTCTCTGCCAGGTA. Предиктор патогенности MutationTaster расценивает выявленный вариант как патогенный. По классификации ACMG данная дупликация относится к вариантам неопределенного клинического значения.

В нашем исследовании среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А ($n = 82$) были обнаружены следующие генетические нарушения: IVS22 – у 45,1% ($n = 37$) пациентов, IVS1 – у 1,2% ($n = 1$), аномальный паттерн IVS1 – у 2,4% ($n = 2$), миссенс-мутации – у 17,1% ($n = 14$), нонсенс-мутации – у 9,8% ($n = 8$), мутации в сайтах сплайсинга – у 6,1% ($n = 5$), небольшие делеции – у 8,5% ($n = 7$), небольшие дупликации – у 8,5% ($n = 7$), крупные делеции – у 1,2% ($n = 1$). Распределение выявленных генетических нарушений у пациентов с тяжелой

формой гемофилии А по классификации Pavlova и соавт. [1] на нулевые и ненулевые мутации было следующим: 60 пациентов имели нулевые мутации, а 22 – ненулевые мутации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате использованного комплексного подхода нарушения в гене *F8* были обнаружены у 99% ($n = 97$) пациентов с гемофилией А. Среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А ($n = 82$) были обнаружены следующие генетические нарушения: IVS22 детектирована у 45,1% пациентов, IVS1 – у 1,2%, аномальный паттерн IVS1 – у 2,4%, миссенс-мутации – у 17,1%, нонсенс-мутации – у 9,8%, мутации в сайтах сплайсинга – у 6,1%, небольшие делеции – у 8,55%, небольшие дупликации – у 8,55%, крупные делеции – у 1,2%. Выявление генетических нарушений, ответственных за развитие гемофилии А, позволяет проводить правильное генетическое консультирование пациентов и их семей, предоставляет информацию о генотип-фенотипической корреляции и риске развития ингибиторов при заместительной терапии, особенно у пациентов с тяжелой формой гемофилии А, а в отдельных случаях позволяет проводить дифференциальную диагностику между схожими по фенотипу коагулопатиями.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» на 2021–2025 гг. (подпрограмма «Здоровье матери и ребенка»), номер госрегистрации 20201768.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Liubushkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6127-7404>

Guryanova I.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9696-3949>

Dmitriev E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0233-7718>

Vertelko V.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0274-2107>

Polyakova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0706-6622>

Volkova L.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1054-0054>

Aleinikova O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0143-1921>

Литература

- Pavlova A., Oldenburg J. Defining Severity of Hemophilia: More than Factor Levels. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39 (7): 702–10.
- Nair P.S., Shetty S.D., Chandrakala S., Ghosh K. Mutations in Intron 1 and Intron 22 Inversion Negative Haemophilia A Patients from Western India. *PLoS One* 2014; 9 (5): 1–9.
- Berntorp E., Fischer K., Hart D.P., Mancuso M.E., Stephensen D., Shapiro A.D., et al. Haemophilia. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7 (45): 45.
- Feng Y., Li Q., Shi P., Liu N., Kong X., Guo E. Mutation analysis in the *F8* gene in 485 families with haemophilia A and prenatal diagnosis in China. *Haemophilia* 2021; 27 (1): 88–92.
- Mazurkiewicz-Pisarek A., Płucieniczak G., Ciach T., Płucieniczak A. The factor VIII protein and its function. *Acta Biochim Pol* 2016; 63 (1): 11–6.
- McVey J.H., Rallapalli P.M., Kemball-Cook G., Hampshire D.J., Giansily-Blaizot M., Gomez K., et al. The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) coagulation factor variant databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* 2020; 26 (2): 306–13.
- Azadmehr S., Rahiminejad F., Motlagh F.Z., Jamali M., Tehrani P.G., Shirzadeh T., et al. The Spectrum of Pathogenic Variants in Iranian Families with Hemophilia A. *Arch Iran Med* 2021; 24 (12): 887–96.
- Villarreal-Martínez L., Ibarra-Ramirez M., Calvo-Anguiano G., Lugo-Trampe J.J., Luna-Záizar H., Martínez-de-Villarreal L.E., et al. Molecular genetic diagnosis by next-generation sequencing in a cohort of Mexican patients with haemophilia and report of novel variants. *Blood Cells Mol Dis* 2020; 83: 102423.
- Salazar-Sánchez L., Jiménez-Cruz G., Mendez M., Chaverri P., Alvarado P., Schröder W., et al. Molecular analysis of FVIII gene in severe HA patients of Costa Rica. *Hamostaseologie* 2010; 4: 150–2.
- Oldenburg J., Pezeshkpoor B., Pavlova A. Historical review on genetic analysis in hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40 (8): 895–902.
- Schwaab R., Pavlova A., Albert T., Caspers M., Oldenburg J. Significance of *F8* missense mutations with respect to inhibitor formation. *Thromb Haemost* 2013; 109 (3): 464–70.
- Gouw S.C., Marijke van den Berg H., Oldenburg J., Astermark J., Groot P.G., Margaglione M., et al. *F8* gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012; 119 (12): 2922–34.
- Oldenburg J., Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12: 15–22.
- Garagiola I., Palla R., Peyvandi F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. *Thromb Res* 2018; 168: 20–7.
- Oldenburg J., Pavlova A. Genetic Basis for Inhibitor Development. *Current and Future Issues in Hemophilia Care* 2011; 79–83.
- Hay C.R.M., Brown S., Collins P.W., Keeling D.M., Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Hemophilia Centre Doctors Organisation. *Br J Haematol* 2006; 133: 591–605.
- Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 830–6.
- Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В., Полякова Е.А., Вертелко В.П., Алейникова О.В. Частота встречаемости инверсии 22 интрона гена фактора VIII среди пациентов детского возраста в Республике Беларусь. *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа* 2022; 8 (1): 41–8.
- Bagnall R.D., Waseem N., Green P.M., Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99 (1): 168–74.
- Kumar P., Faridi N.J., Husain N., Soni P., Goel S.K. Study of intron 22 inversion mutation in north India with review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24 (2): 120–4.
- Abdulqader A.M.R., Mohammed A.I., Rachid S., Ghorraishzadeh P., Mahmood S.N. Identification of the Intron 22 and Intron 1 Inversions of the Factor VIII Gene in Iraqi Kurdish Patients With Hemophilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2020; 26: 1076029619888293.
- Milena Mantilla-Capacho J., Beltrán-Miranda C.P., Luna-Záizar H., Aguilar-López L., Esparza-Flores M.A., López-Guido B., et al. Frequency of intron 1 and 22 inversions of factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007; 82: 283–7.
- De Brasi C., Candela M., Cermelj M., Slavutsky I., Larripa I., Bianco R.P., et al. Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2000; 6: 21–2.
- Corrêa M.C.S.M., Ferreira E., Veiga M.T.A., Bandinelli E., Rosset C. Prevalence of inversions in introns 1 and 22 of the factor VIII gene and inhibitors in patients from southern Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 2019; 55 (6): 598–605.
- Бескорвайная Т.С., Миловидова Т.Б., Щагина О.А., Рыжкова О.П., Поляков А.В. Комплексная диагностика гемофилии А у российских больных. *Генетика* 2019; 55 (8): 1015–24.
- Pio S.F., Oliveira G.C., Soares S., Rezende S.M. An aberrant pattern for intron 1 inversion of factor VIII gene. *Haemophilia* 2011; 17: 703–20.
- Sanna V., Ceglia C., Tarsitano M., Lombardo B., Coppola A., Zarrilli F., et al. Aberrant *F8* gene intron 1 inversion with concomitant duplication and deletion in a severe hemophilia A patient from Southern Italy. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 195–7.
- Badoz M., Pellechia D., Fretigny M. Unusual intron 1 inversion with concomitant large duplication within the *F8* gene in a severe haemophilia A patient. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 807.
- Stefanovska E.S., Dejanova V., Tchakarova P., Petkov G., Efremov G.D. Genetic Inversions among Hemophilia A Patients from Macedonia and Bulgaria. *Acta Haematol* 2008; 120: 192–4.
- You G., Chi K., Lu Y., Ding Q., Dai J., Xi X., et al. Identification and characterisation of a novel aberrant pattern of intron 1 inversion with concomitant large insertion and deletion within the *F8* gene. *Thromb Haemost* 2014; 112 (2): 264–70.
- Jourdy Y., Fretigny M., Nougier C., Négrier C., Bozon D., Vinciguerra C. Splicing analysis of 26 *F8* nucleotide variations using a minigene assay. *Haemophilia* 2019; 25 (2): 306–15.
- Vidal F., Farssac E., Altisent C., Puig L., Gallardo D. Rapid Hemophilia A Molecular Diagnosis by a Simple DNA Sequencing Procedure: Identification of 14 Novel Mutations. *Thromb Haemost* 2001; 85 (4): 580–3.
- El-Maarri O., Herbiniaux U., Graw J., Schröder J., Terzic A., Watzka M., et al. Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (2): 332–9.
- CDC Hemophilia Mutation Project (CHAMP & CHBMP) [Electronic resource]. Available at: <https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html> (accessed December 15, 2020).
- Factor VIII Gene (*F8*) Variant Database [Electronic resource]. Available at: <https://f8-db.eahad.org/index.php> (accessed December 15, 2020).
- Green P.M., Bagnall R.D., Waseem N.H., Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol* 2008; 143: 115–28.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 13.03.2023
Принята к печати 17.04.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-58-64

Факторы риска появления патологических ингибиторов свертывания у детей с тяжелой гемофилией А

Е.В. Дмитриев, А.В. Любушкин

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

Контактная информация:

Дмитриев Евгений Вячеславович,
врач-гематолог ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: jenyadmitriev24@gmail.com

Цель исследования: определить роль потенциальных факторов риска возникновения патологических ингибиторов свертывания у ранее не леченных пациентов (РНЛП) (или минимально леченных пациентов) с тяжелой гемофилией А. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследование включены 89 мальчиков, состоявших на диспансерном учете в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) с 1998 по 2022 г. по поводу тяжелой гемофилии А. Возраст выявления гемофилии, представленный как медиана (10–90-й процентиля), составил 8,0 (1,0–21,0) месяца, базовая активность фактора VIII – 0,7% (0,4–0,95%). Первое введение препаратов фактора свертывания крови VIII выполнено в возрасте 11,0 (1,0–31,0) месяца. Из 89 пациентов ингибиторная форма тяжелой гемофилии А диагностирована у 23 детей. Кумулятивная частота возникновения патологических ингибиторов свертывания в целом по группе среди РНЛП составила $31,0 \pm 5,6\%$. Кумулятивная частота ингибиторных форм гемофилии ($37,0 \pm 6,9\%$) у пациентов с нулевыми мутациями превышала (log-rank-тест, $p = 0,041$) аналогичный показатель ($6,5 \pm 6,0\%$) у пациентов с ненулевыми мутациями. Использование одного и того же плазменного концентрата фактора свертывания крови (КФСК) VIII, разрешенного с периода новорожденности, в том числе и для профилактического введения, было сопряжено ($\chi^2 = 8,53$; $p = 0,004$) со снижением частоты возникновения ингибиторов к фактору VIII до $21,3 \pm 8,5\%$ по сравнению частотой $45,2 \pm 7,8\%$ в группе пациентов, получавших КФСК различных производителей. Возраст (до 1 года или старше) первого введения КФСК не оказал влияния на формирование патологических ингибиторов свертывания (log-rank-тест, $p = 0,746$). Такие показатели, как возраст выявления гемофилии (отношение шансов (ОШ) 0,99; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,931,024; $p = 0,991$), базовая активность фактора VIII (ОШ 0,99; 95% ДИ 0,98–1,06; $p = 0,09$), не были связаны с появлением патологических ингибиторов. Также не были связаны с выявлением ингибиторов результаты первых в жизни ребенка определений отношения величины активированного частичного тромбопластинного времени пациента к величине данного показателя в контроле (ОШ 1,89; 95% ДИ 0,72–5,09; $p = 0,21$) и показателя восстановления (ОШ 0,74; 95% ДИ 0,27–2,01; $p = 0,55$). Мы подтвердили, что одним из основных факторов риска возникновения патологических ингибиторов свертывания в ответ на введение КФСК VIII являются аномалии гена F8. Применение плазменного КФСК VIII, рекомендованного для введения РНЛП с периода новорожденности, одного производителя способствовало снижению частоты возникновения ингибиторов по сравнению с пациентами, получавшими КФСК различных производителей.

Ключевые слова: дети, гемофилия А, факторы риска, ингибиторы свертывания, профилактика ингибиторов

Дмитриев Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 58–64. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-58-64

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 13.03.2023
Accepted 17.04.2023

Risk factors for coagulation inhibitor development in children with severe hemophilia A

E.V. Dmitriev, A.V. Liubushkin

The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

Correspondence:
Evgeny V. Dmitriev,
a hematologist at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Belarus
Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk Region, Belarus
E-mail: jenyadmitriev24@gmail.com

Aim of the study: to examine the role of potential risk factors in inhibitor development in previously untreated patients (PUPs) (or minimally treated patients) with severe hemophilia A. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (the Republic of Belarus). The study included 89 boys who underwent regular follow-up for severe hemophilia A at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (the Republic of Belarus) from 1998 to 2022. The median age (10th–90th percentile) at diagnosis of hemophilia was 8.0 (1.0–21.0) months, the baseline factor VIII activity was 0.7% (0.4–0.95%). Age at first exposure to factor VIII concentrate was 11.0 (1.0–31.0) months. Out of 89 patients, 23 children had severe hemophilia A with inhibitors. The cumulative incidence of inhibitors in the whole group of PUPs was $31.0 \pm 5.6\%$. The cumulative incidence of hemophilia A with inhibitors was higher in the patients with null mutations ($37.0 \pm 6.9\%$) than in the patients with non-null mutations ($6.5 \pm 6.0\%$) (the log-rank test, $p = 0.041$). The use of plasma-derived FVIII concentrate (approved for use in neonates and for prophylaxis) from one manufacturer was associated ($\chi^2 = 8.53$; $p = 0.004$) with a lower incidence of factor VIII inhibitors (up to $21.3 \pm 8.5\%$) compared with the incidence in the group of patients treated with FVIII

concentrates from different manufacturers ($45.2 \pm 7.8\%$). Age (> 1 year old or < 1 year old) at first exposure to FVIII had no effect on the formation of inhibitors (the log-rank test, $p = 0.746$). Such factors as age at diagnosis of hemophilia (odds ratio (OR) 0.99; 95% confidence interval (CI) 0.93–1.024; $p = 0.991$) and baseline factor VIII activity (OR 0.99; 95% CI 0.8–1.06; $p = 0.09$) were not associated with inhibitor development. The first measurements of activated partial thromboplastin time (APTT) ratio (patient APTT value over the APTT reference value) (OR 1.89; 95% CI 0.72–5.09; $p = 0.21$) and FVIII recovery *in vivo* (OR 0.74; 95% CI 0.27–2.01; $p = 0.55$) were not associated with inhibitor development either. We have confirmed that one of the main risk factors for FVIII inhibitor development is F8 gene mutations. The incidence of inhibitors among the patients who received plasma-derived FVIII concentrates (recommended for use in PUPs in the neonatal period) from one manufacturer was lower than among those who received FVIII from different manufacturers.

Key words: children, hemophilia A, risk factors, clotting inhibitors, inhibitor prophylaxis

Dmitriev E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 58–64.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-58-64

Наиболее серьезным осложнением заместительной терапии при тяжелой гемофилии является выработка иммунной системой пациента антител к вводимому экзогенному фактору свертывания, представляющему чужеродный для пациента белок [1, 2]. Эти антитела нейтрализуют гемостатический эффект введенного фактора, что приводит к рецидивирующим эпизодам кровотечения, прогрессирующему повреждению суставов и иногда к угрожающим жизни неотложным состояниям [3]. Возможная роль, которую играют факторы риска в развитии ингибиторов, такие как характер генетических нарушений [4], возраст начала лечения [5], выбор первого лекарственного препарата, режим и интенсивность введения [6], является предметом длительной дискуссии. Дополнительные факторы риска, такие как массивность кровотечения, хирургическое вмешательство [7], сопутствующие инфекции или вакцинации [8], также вовлечены в контекст обсуждения сигналов иммунологической опасности [9], приводящих к иммунным нарушениям, связанным с введением экзогенного фактора свертывания крови для остановки кровотечения.

Данные, представленные в литературе, в большинстве случаев носят наблюдательный характер, противоречивы по многим позициям и, следовательно, не могут твердо поддержать или опровергнуть гипотезу о возможной минимизации иммуногенных осложнений, связанных с выработкой патологических ингибиторов свертывания на введение чужеродного для пациента с гемофилией фактора свертывания.

Возможность снижения частоты образования ингибиторов у ранее не леченных пациентов (РНЛП) с тяжелой гемофилией А путем минимизации воздействия факторов риска изучена недостаточно. Данное обстоятельство определило цель настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследова-

ние включены 89 мальчиков, состоявших на диспансерном учете в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) с 1998 по 2022 г. по поводу тяжелой гемофилии А. Возраст выявления гемофилии, представленный как медиана (10–90-й процентиля), составил 8,0 (1,0–21,0) месяца, базовая активность фактора VIII – 0,7% (0,4–0,95%). Первое введение препаратов свертывания крови VIII выполнено в возрасте 11,0 (1,0–31,0) месяца. Из 89 пациентов ингибиторная форма тяжелой гемофилии А диагностирована у 23 детей.

В зависимости от характера генетических нарушений выделено 2 группы пациентов: 1-я группа – 60 человек с нулевыми мутациями и 2-я группа – 22 пациента с ненулевыми мутациями (таблица 1).

Анализ архивных материалов позволил идентифицировать концентрат факторов свертывания крови (КФСК) VIII, применявшийся на протяжении первых 50 дней введения, у 82 пациентов, а возраст первого введения – у 81 ребенка. Плазменный КФСК VIII одного производителя, разрешенный с периода новорожденности, в том числе и для профилактического введения, получали 50 пациентов, плазменный концентрат различных производителей – 29 детей, рекомбинантный КФСК VIII – 3 ребенка. Выбор лекарственного средства осуществляли в зависимости от наличия препарата в аптеке.

Коагулологические исследования выполнены на автоматическом коагулометре ACL-9000 фирмы Instrumentation Laboratory (США) с использованием оригинальных реагентов. Исследование свертывания крови включало выполнение рутинных хронометрических показателей (активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ), протромбиновое время, тромбиновое время, фибриноген), определение активности фактора VIII одностадийным клоттинговым методом. Ингибитор к фактору VIII в единицах Бетезда (БЕ/мл) определяли методом M. Kasper (1968) с поправкой Nijmegen modification [10]. Использование показателя R (АЧТВ), равного отношению величины показателя АЧТВ пациента к величине данного показателя в контроле (пул нормальной контрольной плазмы), позволяло

Таблица 1

Характеристика выделенных групп пациентов в зависимости от вида генетических аномалий. Медиана (10–90-й процентиля)

Table 1

Patient characteristics according to the type of genetic abnormalities. Median (10th–90th percentiles)

Анализируемый признак Analyzed feature	Характер генетических нарушений, вид мутации The nature of genetic disorders, the type of mutation		
	Нулевые (1-я группа, n = 60) Null mutations (Group 1, n = 60)	Ненулевые (2-я группа, n = 22) Non-null mutations (Group 2, n = 22)	Достоверность различия (U-test) The significance of difference (U-test)
Семейный анамнез по гемофилии: Family history of hemophilia: да, n (%) yes, n (%) нет, n no, n	23 (38,3) 37	14 (63,6) 8	p = 0,132
Базовая активность фактора VIII, % Baseline FVIII activity, %	0,68 (0,35–1,0)	0,72 (0,39–1,05)	p = 0,791
Возраст выявления гемофилии, месяцы Age at diagnosis of hemophilia, months	7,0 (0,2–14,0)	5,5 (0,5–23,0)	p = 0,847
Возраст первого введения КФСК VIII, месяцы Age at first exposure to FVIII, months	9,0 (2,0–16,0)	11,5 (1,5–25,0)	p = 0,623
Количество дней введения КФСК VIII от первого введения до события The number of exposure days to FVIII, from the first exposure day to an event	87,0 (10,0–150,0)	104,0 (25,0–156,0)	p = 0,101
Время от первого введения до события, нед Time from the first exposure to an event, weeks	124,0 (25,0–160,0)	128,0 (17,0–185,0)	p = 0,906
Первый показатель R (АЧТВ) до введения КФСК The first APTT Ratio (R) measurement before the administration of FVIII	2,78 (2,24–3,6)	2,66 (2,08–3,3)	p = 0,275
Коагуляционный ответ на введение КФСК в день выбора режима введения, %/МЕ × кг ⁻¹ Coagulation response to the administration of FVIII on the day when a treatment regimen was chosen, %/ME × kg ⁻¹	1,82 (1,23–3,10) n = 37	1,8 (0,99–2,96) n = 18	p = 0,906
Ингибиторы свертывания: Clotting inhibitors: да, n (%) yes, n (%) нет, n no, n	19 (31,6) 41	1 (4,5) 21	p = 0,027
Пациенты, получавшие плазменный концентрат: Patients who received plasma-derived FVIII concentrate: одного производителя, n from one manufacturer, n различных производителей, n (%) from different manufacturers, n (%)	31 29 (48,3)	19 3 (15,8)	p = 0,191

Примечание. Событие – выявление патологических ингибиторов 0,6 ВЕ/мл и более или достижение 50-го дня введения.

Note. An event is the detection of FVIII inhibitors at ≥ 0.6 BU/mL or the completion of 50 exposure days. APTT – activated partial thromboplastin time.

оценить глубину гипокоагуляции у различных пациентов на момент выявления гемофилии до первого введения КФСК. Регистрация показателя восстановления (*recovery in vivo*), отражающего прирост коагуляционной активности на введение КФСК VIII в дозе 1 МЕ/кг на момент принятия решения о выборе режима введения препарата могла косвенно указать на потенциальную возможность появления ингибиторной формы заболевания. Для исследований на каждом этапе требовалось до 1,5 мл стабилизированной цитратом натрия (1:9) крови, взятой путем пункции периферической вены без наложения жгута.

Для проведения генетического исследования гена *F8* было получено информированное согласие родителей пациентов, утвержденное этическим комитетом ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). Для генетического исследования использовали кровь, полученную путем пункции периферической вены и стабилизированную калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты

(К₂ЭДТА). После лизиса эритроцитов из лейкоцитарной суспензии стандартным методом фенол-хлороформной экстракции выделяли геномную ДНК. Инверсию 22-го интрона гена *F8* выявляли по протоколу выполнения инвертированной полимеразной цепной реакции, описанному Rossetti и соавт. (2005, 2008) [11, 12] с небольшими модификациями [13]. Детекцию инверсии 1-го интрона гена *F8* проводили по протоколу Vagnall и соавт. [14]. Генетический анализ всех экзонов и прилегающих к ним регионов сплайс-сайтов гена *F8* выполняли с применением кастомной панели (Qiagen, Германия), включающей гены *F8*, *F9*, *VWF*, *ADAMTS13*, *F13A1*, *F13B*, методом высокопроизводительного секвенирования на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США). Все клинически значимые изменения подтверждали с помощью капиллярного секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Scientific, США). По результатам генетического исследования 82 пациентов в гене *F8* были выявлены следующие генетические нарушения:

инверсия 22-го интрона обнаружена у 37 детей, инверсия 1-го интрона – у 1, аномальный паттерн инверсии 1-го интрона – у 2, миссенс-мутации – у 14, нонсенс-мутации – у 8, мутации в сайтах сплайсинга – у 5, небольшие делеции – у 7, небольшие дупликации – у 7, крупная делеция – у 1. Генетические нарушения, которые по классификации Pavlova и соавт. [15] отнесены к нулевым мутациям, выявлены у 60 пациентов, к ненулевым мутациям – у 22 мальчиков. Среди 20 пациентов с ингибиторной формой тяжелой гемофилии А, включенных в исследование, инверсию 22-го интрона имели 15 мальчиков, из них с транзиторным типом ингибитора – 4. Транзиторный тип ингибитора также имели 5 детей: нонсенс-мутацию – 1 пациент, мутации в сайтах сплайсинга – 3, миссенс-мутацию – 1.

Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 6.0. Результаты представлены как медиана (10–90-й процентиля). Достоверность различия (для $p < 0,05$) в сравниваемых выборках определена по критерию Манна–Уитни (U-test). Взаимосвязь анализируемых показателей определяли непараметрическим критерием Gamma (G). Для оценки взаимосвязи между предикторными переменными и частотой события во времени использовали регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса. Дискретные величины анализируемых признаков после построения характеристической кривой и расчета порогового значения были переведены в бинарную систему отклика. Кумулятивную частоту патологических ингибиторов к фактору свертывания VIII рассчитывали методом Каплана–Мейера, сравнение результатов проводили с использованием критерия log-rank. При оценке значимости статистических различий использовали порог значений для $p < 0,05$. Цензурирование наблюдений произведено на 29.05.2022.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среди 89 мальчиков с тяжелой гемофилией А на протяжении 22 лет патологические ингибиторы к фактору свертывания крови VIII обнаружены у 23. Кумулятивная частота выявления патологических ингибиторов свертывания среди 89 пациентов с тяжелой гемофилией А составила $31,0 \pm 5,6\%$ (рисунок 1).

Выявлена тесная корреляционная зависимость (таблица 2) между фактом выявления патологических ингибиторов свертывания, с одной стороны, и регистрацией нулевых мутаций гена F8 ($G = -0,81$; $p = 0,0001$), использованием в первые 50 дней введения КФС VIII различных производителей ($G = 0,607$; $p = 0,0001$), семейным гемофилическим анамнезом (наличие тяжелой гемофилии А у других членов семьи мужского пола) ($G = 0,35$; $p = 0,023$) – с другой.

Рисунок 1

Кумулятивная частота ингибиторной формы тяжелой гемофилии А у детей с 1998 по 2022 г.

Figure 1

The cumulative incidence of severe hemophilia A with inhibitors in children, from 1998 to 2022

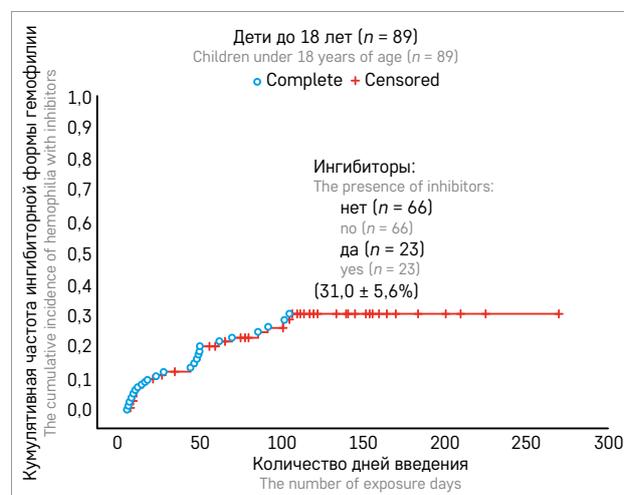


Таблица 2

Взаимосвязь анализируемых признаков с выявлением патологических ингибиторов свертывания у детей с тяжелой гемофилией А

Table 2

A correlation between the analyzed factors and the presence of clotting inhibitors in children with severe hemophilia A

Анализируемый признак Analyzed factor	Коэффициент Gamma Gamma coefficient	p
Генетическая мутация (нулевая/ненулевая) Genetic mutation (null or non-null)	-0,81	0,0001
Пациенты, получавшие первые 50 дней введения КФС одного производителя, – 1, различных производителей – 2 Patients who received factor VIII products for the first 50 exposure days from one manufacturer – 1, from different manufacturers – 2	0,61	0,0001
Семейный гемофилический анамнез (да/нет) Family history of hemophilia (yes/no)	0,35	0,023
Базовая активность фактора VIII, % Baseline factor VIII activity, %	-0,062	0,610
Возраст выявления гемофилии А, месяцы Age at diagnosis of hemophilia A, months	-0,032	0,794
Возраст первого введения КФС VIII, месяцы Age at first exposure to FVIII, months	-0,045	0,718
Показатель R (АЧТВ), пациент/контроль (первое определение в жизни пациента) APTT ratio (R), patient/control ratio (the first measurement)	0,048	0,710
Показатель восстановления (R) перед принятием решения о режиме введения Recovery value (R) before deciding on the mode of treatment	-0,239	0,162

Генетические факторы риска возникновения ингибиторов свертывания

Среди 60 пациентов с нулевыми мутациями, приводящими к нарушению синтеза фактора свертывания крови VIII, ингибиторная форма гемофилии

диагностирована у 19. Среди 22 пациентов с ненулевыми мутациями, при которых замена аминокислотного остатка в молекуле лекарственного средства приводит к потере гемостатического эффекта синтезируемого белка, патологические ингибиторы свертывания к фактору VIII выявлены только у 1 ребенка. Кумулятивная частота выявления патологических ингибиторов к фактору свертывания крови VIII при тяжелой гемофилии А у пациентов с нулевыми мутациями ($38,6 \pm 7,3\%$) превышала (log-rank-тест, $p = 0,014$) аналогичный показатель, зарегистрированный у мальчиков с ненулевыми мутациями ($4,6 \pm 4,4\%$) (рисунок 2).

Относительный риск (ОР) возникновения ингибиторной формы гемофилии при нулевых мутациях в пределах 95% доверительного интервала (ДИ) в 6,97 (0,99–49,0) раза выше, чем при ненулевых. Это подтверждала величина $\chi^2 = 8,05$ ($p = 0,005$) с поправкой на правдоподобие.

Выбор концентрата фактора свертывания крови как фактора риска возникновения ингибиторов свертывания

Среди 50 пациентов, получавших плазменный КФС VIII (одного производителя), рекомендованный для детей с периода новорожденности, в том числе и для профилактического применения, патологические ингибиторы свертывания возникли у 8 (16,0%) детей, не зарегистрировано появление ингибиторов у 42 (84,0%); кумулятивная частота возникновения ингибиторов составила $21,3 \pm 8,5\%$. Плазменный КФС VIII разных производителей ($n = 29$) и рекомбинантный КФС VIII ($n = 3$) получали 32 пациента: патологические ингибиторы выявлены у 13 (40,0%), не выявлено ингибиторов у 18 (56,0%). Кумулятивная частота появления патологических ингибиторов свертывания среди пациентов, получавших КФС различных производителей ($45,2 \pm 7,8\%$), почти в 2 раза превышала ($p = 0,027$) аналогичный показатель у детей, получавших плазменный КФС VIII (одного производителя), рекомендованный для детей с периода новорожденности ($21,3 \pm 8,5\%$). Использование КФС различных производителей на протяжении первых 50 дней введения повышало риск появления патологических ингибиторов свертывания к фактору VIII по сравнению с использованием плазменного КФС одного производителя (ОР 2,88; 95% ДИ 1,36–6,07).

Возраст первого введения концентрата фактора свертывания крови как фактор риска возникновения ингибиторов свертывания

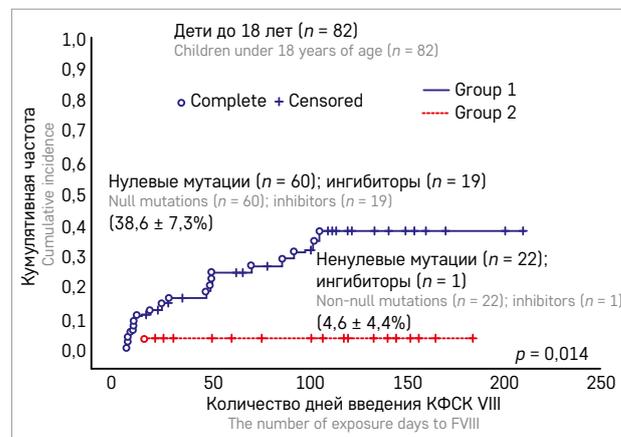
Возраст первого дня введения КФС в 81 наблюдении варьировал от 1 до 28 месяцев. В возрасте до 1 года первое введение КФС выполнено 46 паци-

Рисунок 2

Кумулятивная частота возникновения патологических ингибиторов свертывания к фактору VIII в зависимости от генетических нарушений при тяжелой гемофилии А у детей (1998–2022 гг.)

Figure 2

The cumulative incidence of inhibitor development to factor VIII according to the genetic abnormalities in severe hemophilia A in children (1998–2022)



ентам: патологические ингибиторы свертывания выявлены у 13 (28,0%) детей, не возникло ингибиторов у 33 (72,0%) младенцев. Кумулятивная частота выявления патологических ингибиторов свертывания составила $34,1 \pm 7,4\%$. В возрасте старше 1 года первое введение КФС выполнено 35 пациентам: ингибиторы зарегистрированы у 9 (26,0%) мальчиков, не выявлено ингибиторов у 26 (74,0%) малышей. Кумулятивная частота выявления патологических ингибиторов свертывания составила $28,0 \pm 8,0\%$. Возраст первого введения КФС на формирование патологических ингибиторов свертывания влияния не оказал (log-rank-тест, $p = 0,746$). Это подтверждала величина показателя ОР (1,099; 95% ДИ 0,53–2,27). Преобладание нулевых мутаций (10:1) в группе детей до 1 года по сравнению с более старшими пациентами (2:1) не влияло на возникновение ингибиторов свертывания ($\chi^2 = 1,726$; $p = 0,189$).

Значение других предикторов появления патологических ингибиторов свертывания

Для выявления риска возникновения патологических ингибиторов свертывания для каждой из предикторных переменных, характеризующих пациента, проведен однофакторный анализ (таблица 3).

Такие показатели, как возраст выявления гемофилии (ОШ 0,99; 95% ДИ 0,93–1,024; $p = 0,991$), базовая активность фактора VIII (ОШ 0,99; 95% ДИ 0,98–1,06; $p = 0,09$), не были связаны с появлением патологических ингибиторов. Также не были связаны с выявлением ингибиторов результаты первого в жизни ребенка определения отношения величины АЧТВ пациента к величине данного показателя в контроле (ОШ 1,89; 95% ДИ 0,72–5,09;

Таблица 3

Однофакторный анализ признаков, характеризующих пациентов, в качестве предикторов ингибиторной формы заболевания

Table 3

A univariate analysis of patient characteristics as predictors of inhibitor development

Анализируемый признак Analyzed factor	<i>p</i>	Отношение шансов Odds ratio	-95% ДИ -95% CI	+95% ДИ +95% CI
Первый R (АЧТВ)*: > 3,21 – 2; < 3,20 – 1 First APTT ratio (R) measurement*: > 3.21 – 2; < 3.20 – 1	0,21	1,89	0,72	5,09
Восстановление (R)*: ≤ 1,56%/МЕ × кг ⁻¹ – 1; > 1,57%/МЕ × кг ⁻¹ – 2 Recovery (R)*: ≤ 1.56%/IU × kg ⁻¹ – 1; > 1.57%/IU × kg ⁻¹ – 2	0,55	0,74	0,27	2,01
Семейный анамнез (да/нет) Family history (yes/no)	0,1	1,76	0,89	3,4
Базовый фактор VIII*: < 0,79% – 1; ≥ 0,8% – 2 Baseline FVIII*: < 0.79% – 1; ≥ 0.8% – 2	0,11	2,56	0,82	8,01
Возраст выявления гемофилии*: < 1 года – 1; > 1 года – 2 Age at diagnosis of hemophilia*: < 1 year – 1; > 1 year – 2	0,99	0,99	0,93	1,024

Примечание. * – пороговое значение показателя рассчитано на основании анализа Рок-кривой (receiver-operator characteristic curve).
Note. * – the threshold value of the indicator was determined using the ROC (receiver operator characteristic) curve. CI – confidence interval.

$p = 0,21$) и показателя восстановления (ОШ 0,74; 95% ДИ 0,27–2,01; $p = 0,55$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты 22 исследований, проведенных с 1990 по 2018 г., отражающих возникновение патологических ингибиторов свертывания у 819 РНЛП с тяжелой гемофилией А, показали кумулятивную частоту развития ингибитора любого титра 17% и выше для продуктов, полученных из плазмы, и 26–40% – для рекомбинантных [4]. Рандомизированное исследование SIPPET (Survey of Inhibitors in Plasma-Product Exposed Toddlers) частоты возникновения патологических ингибиторов у 251 РНЛП, получавших лечение рекомбинантными ($n = 126$) 2–3-го поколения или плазменными ($n = 125$) концентратами фактора VIII показало частоту всех ингибиторов с плазменным фактором VIII 26,8% (95% ДИ 18,4–35,2) и 44,5% (95% ДИ 34,7–54,3) с рекомбинантным фактором VIII [3]. Среди пациентов с высоким риском (нулевые мутации) кумулятивная частота возникновения ингибиторов составила 31% (95% ДИ 22–41) при лечении плазменным фактором VIII и 47% (95% ДИ 36–58) – при лечении рекомбинантным фактором VIII 2–3-го поколения [16].

Согласно представленным нами результатам, кумулятивная частота возникновения патологических ингибиторов свертывания в целом по группе среди РНЛП, получавших преимущественно (79 из 82) плазменный КФСР VIII составила $31,0 \pm 5,6\%$. ОР возникновения ингибиторов к фактору свертывания крови VIII при нулевых мутациях в пределах 95% ДИ был в 6,97 (0,99–49,0) раза выше, чем при ненулевых. Кумулятивная частота ингибиторных форм гемофилии у пациентов с нулевыми мутациями ($38,6 \pm 7,3\%$) превышала (log-rank-тест, $p = 0,014$) аналогичный показатель у пациентов с ненулевыми мутациями ($4,6 \pm 4,4\%$).

Возраст первого введения КФСР VIII (до 1 года или старше) РНЛП с тяжелой гемофилией А суще-

ственно не влиял ($\chi^2 = 0,065$; $p = 0,799$) на частоту выявления ингибиторов к фактору свертывания крови VIII. Использование одного и того же плазменного КФСР VIII, разрешенного с периода новорожденности, в том числе и для профилактического введения, было сопряжено ($\chi^2 = 8,53$; $p = 0,004$) со снижением частоты возникновения ингибиторов к фактору VIII до $21,3 \pm 8,5\%$ по сравнению с кумулятивной частотой $45,2 \pm 7,8\%$ в группе пациентов, получавших КФСР различных производителей.

Используя характеристики пациентов, доступные на момент принятия решения о выборе лекарственного средства и режима его введения, такие как возраст выявления гемофилии, возраст первого введения КФСР, величина АЧТВ на момент диагностики гемофилии, базовая активность фактора VIII, величина показателя восстановления, не представляется возможным определить вероятность возникновения патологических ингибиторов свертывания к вводимому КФСР VIII. Мы подтвердили, что единственный доступный предиктор повышенного риска появления патологических ингибиторов свертывания – выявление типа мутации гена *F8*.

Следует отметить, что существенным недостатком настоящего исследования является малочисленность выборки, объединившей на протяжении более 22 лет 89 пациентов. При условии рандомизации в соотношении 1:1, увеличении числа пациентов с вновь выявленными ингибиторами от 30% в контрольной группе до 40% в группе пациентов с исследуемым препаратом, мощностью исследования 80% и вероятностью ошибки первого типа 5% для отклонения нулевой гипотезы численность включенных в исследование пациентов должна быть не менее 356 [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наша работа подтвердила мнение исследователей о том, что одним из основных факторов риска

возникновения патологических ингибиторов свертывания в ответ на введение КФС VIII являются аномалии гена *F8*. Использование плазменного КФС VIII, рекомендованного для введения РНП с периода новорожденности, от одного производителя способствовало снижению частоты возникновения ингибиторов по сравнению с пациентами, получавшими КФС различных производителей. Возраст первого введения КФС (до 1 года или старше) на возникновение ингибиторов свертывания существенного значения не оказывал. Такие показатели, как возраст выявления гемофилии (ОШ 0,99; 95% ДИ 0,93–1,024; $p = 0,991$), базовая активность фактора VIII (ОШ 0,99;

95% ДИ 0,98–1,06; $p = 0,09$), с появлением патологических ингибиторов связаны не были.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Dmitriev E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0233-7718>

Liubuschkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6127-7404>

Литература

- Collins P.W., Palmer B.P., Chalmers E.A., Hart D.P., Liesner R., Rangarajan S., et al.; UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. Factor VIII brand and the incidence of factor-VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe haemophilia A, 2000–2011. *Blood* 2014; 124: 3389–97.
- Fischer K., Lassila R., Peyvandi F., Calizzani G., Gatt A., Lambert T., et al.; EUHASS Participants. Inhibitor development in haemophilia according to concentrate. Four-year results from the European Haemophilia Safety Surveillance (EUHASS) project. *Thromb Haemost* 2015; 113: 968–75.
- Peyvandi F., Mannucci P.M., Garagiola I., El-Beshlawy A., Elalfy M., Raman V., et al. Randomized trial of Factor VIII and neutralizing antibodies in hemophilia A. *N Engl J Med* 2016; 374: 2054–64.
- Keipert C., Drechsel-Bäuerle U., Oberle D., Müller-Olling M., Hilger A. Epidemiological Challenges in Rare Bleeding Disorders: FVIII Inhibitor Incidence in Haemophilia A Patients – A Known Issue of Unknown Origin. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18: 225. DOI: 10.3390/ijerph18010225
- Liesner R.J., Abraham A., Altisent C., Belletrutti M.J., Carcao M., Carvalho M., et al. Simoctocog Alfa (Nuwiq) in Previously Untreated Patients with Severe Haemophilia A: Final Results of the NuProtect Study. *Thromb Haemost* 2021; 121 (11): 1400–8. DOI: 10.1055/s-0040-1722623
- Lorenzo J.I., Lopez A., Altisent C., Aznar J.A. Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. *Br J Haematol* 2001; 113: 600–3.
- Van der Bom J.G., Mauser-Bunschooten E.P., Fischer K., van den Berg H.M. Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe haemophilia. *Thromb Haemost* 2003; 89: 475–9.
- Gouw S.C., van den Berg H.M., Fischer K., Auerswald G., Carcao M., Chalmers E., et al.; PedNet and RODIN Study Group. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood* 2013; 121: 4046–55. DOI: 10.1182/blood-2012-09-457036
- Hashemi S.M., Fischer K., Gouw S.C., et al.; on behalf of PedNet Study Group. Do vaccinations influence the risk of inhibitor development in patients with severe hemophilia A? Abstracts of the XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 (Suppl S2): 147.
- Hay C.R.M., Broun S., Collins P.W., Keeling D.M., Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Hemophilia Centre Doctors Organisation. *Br J Haematol* 2006; 133: 591–605.
- Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by Use of Inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51 (7): 1154–8.
- Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int 22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 830–6.
- Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В., Полякова Е.А., Вертелко В.Р., Алейникова О.В. Частота встречаемости инверсии 22 интрона гена фактора VIII среди пациентов детского возраста в Республике Беларусь. *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа* 2022; 8 (1): 41–8.
- Bagnall R.D., Waseem N., Green P.M., Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99 (1): 168–74.
- Pavlova A., Oldenburg J. Defining severity of hemophilia: more than factor levels. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39 (7): 702–10.
- Rosendaal F.R., Palla R., Garagiola I., Mannucci P.M., Peyvandi F.; SIPPET Study Group. Genetic risk stratification to reduce inhibitor development in the early treatment of hemophilia A: a SIPPET analysis. *Blood* 2017; 130 (15): 1757–9. DOI: 10.1182/blood-2017-06-791756

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-65-67

The impact of interferon-gamma level on the health status of patients with sickle cell disease in Basrah

W.N. Ibraheim¹, H.A. Jasim¹, A.S. Abdullah²¹College of Medicine, University of Basrah, Iraq²Al-Sadder Teaching Hospital, Oncology & Hematology Centre, Basrah, Iraq

Sickle cell disease (SCD) is one of the most prevalent autosomal recessive diseases, characterized by the generation of abnormal hemoglobin S. Our study aimed to assess how the serum level of interferon-gamma affects the health status of patients with SCD in Basrah. A total of 90 participants were enrolled in this study and divided into two main groups: a SCD group and a control group. The SCD group included 30 patients with SCD in steady state and 30 patients with SCD in vaso-occlusive crisis; the control group included 30 age- and sex- matched apparently healthy individuals. Approval was obtained from the Research Ethics Committee of the College of Medicine, University of Basrah before conducting the study. Two milliliters of venous blood were drawn from all the participants, and ELISA tests were utilized to determine the levels of serum interferon-gamma. There was a statistically significant increase in the serum level of interferon-gamma among SCD patients (both in steady state and in crisis) compared to the control group ($p = 0.05$). There were no significant differences in the levels of interferon-gamma between the patients in steady state and during vaso-occlusive crisis ($p > 0.05$). Interferon-gamma may influence the general health of sickle cell patients and contribute to the cause of inflammation, no matter whether the patient is in stable condition or is experiencing a crisis.

Key words: sickle cell disease, interferon-gamma, vaso-occlusive crisis

Ibraheim W.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 65–7.

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-65-67

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 02.05.2023

Accepted 09.06.2023

Correspondence:Hanadi A. Jasim,
College of Medicine,
University of Basrah, Iraq
Address: 61001, Basrah, Iraq
E-mail: medicalresearch11@yahoo.com

One of the most prevalent autosomal recessive diseases – sickle cell disease (SCD) – is characterized by the generation of abnormal hemoglobin S and is associated with substantial morbidity and mortality, poor quality of life and short life expectancy. SCD is one of the genetic disorders that affects people worldwide, and the Middle East, Mediterranean areas, Southeast Asia, Saudi Arabia, and sub-Saharan Africa have the highest prevalence rates [1].

Under low oxygen tension, hemoglobin S forms crystals. Deoxygenated sickle hemoglobin polymerizes into long fibers, thereby changing the normal morphology of red blood cells and transforming them into a crescent shape [1]. As a result, the cell is vulnerable to several intracellular and membrane alterations. The ability of red blood cells to regain their original shape and adhere to blood vessel walls is impacted by these alterations [2].

SCD is frequently characterized by painful vaso-occlusive crisis (VOC), recurring infections, and chronic inflammation. Cytokines are a general term for a large group of secreted molecules involved in cell-to-cell signaling during immune responses. Interferon-gamma (IFN- γ) is released from the activated TH1 cells [3]. As a result of cell death caused by ischemia, molecules linked to severe inflammatory damage (DAMPs) are released. These subsequently promote a number of

inflammatory pathways. The activation of NK cells, which can cause pneumonitis by producing IFN- γ and IFN- γ -induced chemokines, is one of the results of ischemia perfusion damage. Damage from ischemia-reperfusion injury is caused by calcium overload and ROS production [2].

Severe VOC are caused by complicated, multifaceted mechanisms. Sickle red blood cells play a role in nearly all clinical presentations of SCD and contribute to the initial VOC process. Patients with SCD have higher levels of multiple cytokines during steady state and VOC [4].

Monocytes, polymorphonuclear neutrophils, and platelets are also actively involved in numerous adhesive contacts. Therefore, hemolysis, infections, and clinical and subclinical microcirculation occlusions are important factors stimulating the production of cytokines and acute-phase proteins [5].

In our study, we will measure IFN- γ levels in order to better understand its role in the pathophysiology of sickle cell crisis.

MATERIALS AND METHODS

Study design and setting

From August 2022 to January 2023, 60 SCD (hemoglobin SS) patients (30 patients in steady state (patient stability is generally good) [6] and 30 patients

in VOC) were enrolled in this cross-sectional study. All patients who had been diagnosed and registered at Basrah Center for Hereditary Blood Diseases were examined during their subsequent visits to the clinic, along with 30 apparently healthy controls who were age- and gender-matched to the patients. Approval was obtained from the Research Ethics Committee of the College of Medicine, University of Basrah before conducting the study.

Assessment of serum interferon-gamma levels

Approximately 2 mL of venous blood were collected from each participant into a gel tube and allowed to coagulate. Then, serum was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes and stored in deep freeze (-20°C) for the measurement of INF- γ using a commercially available ELISA kit (KAC1231, the Human INF- γ solid-phase sandwich ELISA kit from Invitrogen). The manufacturer's instructions were followed.

Inclusion criteria:

- 1) children with SCD confirmed by hemoglobin electrophoresis;
- 2) children with SCD (hemoglobin SS) in steady state and during VOC;
- 3) signed Informed consent from the participants' parents.

Exclusion criteria:

- 1) patients who were hepatitis B or C positive;
- 2) patients lost to follow-up.

Statistical analysis

The level of serum INF- γ was treated as a non-parametric variable and inter-group comparison was performed using the Kruskal-Wallis test to identify statistically significant differences at $p \leq 0.05$.

RESULTS

We enrolled 60 patients with SCD and 30 apparently healthy subjects (with no history of blood disorder) as a control group. The subjects were from 2 to 15 years of age. The mean age of the patients in steady state and in VOC was 8.05 ± 3.88 years and 8.48 ± 3.79 years, respectively; the mean age of the controls was 8.58 ± 3.82 years. There were no significant differences in the mean age of the cases and the controls ($p > 0.05$). There were 18 (60%) females and 12 (40%) males in the group of SCD patients in steady state, while in the group of SCD patients in VOC, there were 11 (36.7%) females and 19 (63.3%) males (table 1).

It was found that the SCD patients, both in crisis and in steady state, had a statistically significant higher level of INF- γ than the healthy controls ($p < 0.05$) as seen in table 2 and table 3.

INF- γ levels did not significantly differ between the patients in steady state and in crisis ($p > 0.05$) as in table 4.

DISCUSSION

INF- γ is a lymphokine produced by activated T (and NK) cells. The INF-gene encodes a 146-amino-acid protein, which is post-translationally processed into two species with different glycosylation patterns, 20 kDa and 25 kDa. Natural INF- γ is highly basic, pH2-labile, and can aggregate to physiologically active dimers. INF- γ plays a role in regulating cell proliferation, innate immunity, and adaptive immunity. It is a key macrophage activating factor that also controls the differentiation process of myeloid cells [7].

Our study showed that the SCD patients during VOC and in steady state had statistically higher levels of INF- γ than the controls ($p < 0.05$). This is in agreement with findings reported by Khalifa et al. [8] and Pathare et al. [5], who proved that in sickle cell patients, elevated levels of INF- γ may lead to tissue damage and inflammation, thus exacerbating morbidity and mortality.

We found no statistically significant difference in the levels of INF- γ between stable sickle cell patients

Table 1
Characteristics of the study population

Variables	Patients with SCD in steady state (n = 30)	Patients with SCD in crisis (n = 30)	Controls (n = 30)	p-value
Age (mean \pm SD), years	8.05 ± 3.88	8.48 ± 3.79	8.58 ± 3.82	0.25
Sex (male/female), n (%)	12 (40)/18 (60)	19 (63.3)/11 (36.7)	12 (40)/18 (60)	0.66

Table 2
The difference between serum levels of INF- γ in the patients with SCD in steady state and in the control group

Group	Mean \pm SE	p-value
Patients with SCD in steady state (n = 30)	14.7 ± 0.41	0.002
Controls (n = 30)	4.61 ± 0.22	

Table 3
The difference between serum levels of INF- γ in the patients with SCD in crisis and in the control group

Group	Mean \pm SE	p-value
Patients with SCD in crisis (n = 30)	12.46 ± 0.61	0.0001
Controls (n = 30)	4.88 ± 0.38	

Table 4
The difference between serum levels of INF- γ in the patients with SCD in crisis and in steady state

Group	Mean \pm SE	p-value
Patients with SCD in steady state (n = 30)	12.46 ± 0.61	0.15
Patients with SCD in crisis (n = 30)	14.79 ± 0.39	

and those in crisis, which may be related to the small sample size. This is also in agreement with the Nnodim et al. [9] and Khalifa et al. [8], who reported a considerable elevation in the serum level of IFN- γ in SCA children, but in contrast to Musa et al. [10] finding that there was no significant change.

Based on immunological data, A. Mahmoud demonstrated a significant rise in IFN- γ in SCD patients in VOC compared to SCD patients at steady state and controls, while similar amounts of IFN- γ were found in the 2 patient groups by Mahmoud [5], Okongwu et al. [1].

A number of studies have shown that serum cytokine levels are elevated even in steady-state SCD. Considerable subclinical microvascular occlusions are thought to occur during steady-state SCD as a result of continuous necrosis and localized tissue ischemia. Increased adhesiveness of sickle reticulocytes and reversibly sickled erythrocytes to the vascular endothelium causes these subclinical micro-infarctions [3].

The regulation of lymphocyte effector mechanisms by local patterns of cytokine and hormone production is now well understood. Th1 cells, mainly producing such cytokines as IFN- γ , tumor necrosis factor- β , and IL-2, may promote the production of IgG2a opsonizing and complement-fixing antibodies, activate macrophages,

and cause delayed-type hypersensitivity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity [5].

IL-12 binds to IL-12 receptors on the surface of T cells and induces the secretion of IFN- γ . Repeated infections associated with non-pathogenic mycobacteria, are common in children with defects in genes encoding IL-12, IL-12 receptor, or IFN- γ receptor [2].

Lastly, our results demonstrated a statistically significant increase in the level of IFN- γ in the SCD patients both in steady state and in VOC in comparison to the healthy controls. In sickle cell patients, either in stable condition or during VOC, IFN- γ may contribute to the etiology of inflammation.

CONCLUSION

IFN- γ may influence the general health of sickle cell patients and contribute to the cause of inflammation, no matter whether a patient is in a stable condition or is experiencing a VOC.

FUNDING

Not specified.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Okongwu C.I., Fasola F.A., Adekanmi A.J., Onifade A.A. Morbidity pattern and interferon gamma level in sickle cell anemia patients with autosplenectomy. *Niger J Clin Pract* 2018; 21 (12): 1615–21.
- Obeagu E.I., Muhimbura E., Kagen-derezo B.P., Uwakwe O.S., Nakyeyune S., Obeagu G.U. An Update on Interferon Gamma and C Reactive Proteins in Sickle Cell Anaemia Crisis. *J Biomed Sci* 2022; 11 (10): 84.
- Conran N., Belcher J.D. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018; 68 (2–3): 263–99.
- Mahmoud A. Evaluation of immunological role of Interferon gamma, Interleukin-10 and CD4⁺ T lymphocytes in pediatric patients with sickle cell disease. *Al-Azhar University Journal of Virus Researches and Studies* 2020; 2(1): 1–15.
- Pathare A., Al Kindi S., Alnaqdy A.A., Daar S., Knox-Macaulay H., Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol* 2004; 77 (4): 323–8.
- Aliu R., Iliya J., Quadri O.R., Ibrahim O.R., Daniel E. Haematological Profile of Children With Sickle Cell Anaemia in Steady State. *Cureus* 2020; 12 (10): e11011.
- Mah A.Y., Cooper M.A. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production. *Crit Rev Immunol* 2016; 36 (2): 131–47.
- Khalifa A.M., Albeladi B.M., Amin H.A., Johari N.M., Alosaimi R.S., Hamdi W.A., et al. Role of interferon gamma in the pathogenesis of sickle cell crisis. *UPI J Pharm Med Health Sci* 2018; 1 (2): JPMHS13.
- Nnodim J., Meludu S.C., Dioka C.E., Martin I., Ukaibe N., Ihim A. Cytokine expression in homozygous SCA. *Journal of Krishna Institute of Medical Science University* 2015; 4 (1): 34–7.
- Musa B.O.P., Onyemelukwe G.C., Hambolu J.O., Mamman A.I., Albarka H.I. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in Sickle Cell Disease patients in vaso-occlusive crisis. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17 (4): 602–8. DOI: 10.1128/CVI.00145-09

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO1»
Received 02.05.2023
Accepted 09.08.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-68-73

Helicobacter pylori infection in children with immune thrombocytopenia

Seham M. Ragab¹, Mahmoud A. El-Hawy¹, Samah M. Awad², Walaa Alaa Soliman¹, Asmaa A. Mahmoud¹

¹Menoufia University, Menoufia, Egypt

²National Liver Institute, Menoufia University, Menoufia, Egypt

Correspondence:

Mahmoud Ahmed El-Hawy,
Department of Pediatrics, Faculty
of Medicine, Menoufia University,
Shebin El Kom, Egypt
Address: Shebin El Kom,
32511 Menoufia, Egypt
E-mail: mahmodelhawy18@yahoo.com

To detect the association between *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and immune thrombocytopenia in children and adolescents. Immune thrombocytopenia (ITP) is a common bleeding disorder in childhood. *H. pylori* is a widespread organism that is present in about 50% of the global population. There is an obvious relation between helicobacter pylori infection and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. A cross-sectional study was conducted in 95 patients with ITP who were recruited from the Hematology Unit, Department of Pediatrics, Menoufia University Hospital in the period from June 2021 to June 2022. The age of the patients ranged between 3.5 and 7.5 years. Fifty-five of them were males and 40 were females. The study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine, Menoufia University. Out of the studied ITP children, 62 (65.3%) were positive for *H. pylori* antigen in stool, and 33 (34.7%) were negative. There was a significant difference between *H. pylori*-positive and *H. pylori*-negative patients regarding the grade of bleeding at presentation; 51 (82.3%) *H. pylori*-positive patients presented with grade 3 bleeding, 35 (56.5%) of them presented with skin and gum bleeding, 16 (25.8%) presented with skin bleeding and epistaxis. There was a statistically significant difference in the rate of recovery between *H. pylori*-negative patients (78.8%) and *H. pylori*-positive patients (22.6%). There was a significant rise in the platelet count in *H. pylori*-positive patients after the treatment of *H. pylori*. The prevalence of *H. pylori* infection in ITP pediatric patients was 65.3%. There was a significant rise in the platelet count in *H. pylori*-positive ITP children after the treatment of *H. pylori*.

Key words: children, *Helicobacter pylori*, immune thrombocytopenia

Seham M. Ragab, et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 68–73.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-68-73

Immune thrombocytopenia (ITP) in childhood is characterized by isolated thrombocytopenia (platelet count < 100,000/microliter with normal white blood cell count and hemoglobin level) in the absence of other disorders, causing thrombocytopenia [1].

The cause of ITP remains unknown in most cases, but it can be triggered by a viral infection or other immunologic or environmental triggers [2].

ITP was previously known as idiopathic thrombocytopenic purpura or immune thrombocytopenic purpura. The current term Immune Thrombocytopenia preserves the widely-recognized acronym "ITP", while acknowledging the immune-mediated mechanism of the disorder and that patients may have little or no signs of purpura or bleeding [3].

ITP is further categorized into three phases based on the timing and continuation of symptoms. Newly diagnosed ITP is defined as from the time of diagnosis to 3 months from initial diagnosis. Persistent ITP is the continuation of ITP from 3 to 12 months from initial diagnosis and chronic ITP is the continuation of ITP after 12 months from initial diagnosis until resolution [4].

Corticosteroids are usually considered the 1st-line of treatment in ITP; however, during tapering or

after discontinuation, the sustained response may be reduced. Patients without sustained response to corticosteroids need other drugs. Intravenous immune globulin (IVIG) and anti-D globulin (anti-Rho) are other 1st-line pharmacological treatments. Rituximab, thrombopoietin agonists (e. g., romiplostim and eltrombopag), and splenectomy are considered the 2nd-line treatment in chronic ITP [5].

H. pylori is a gram-negative bacillus that colonizes the gastric cells. Fecal-oral or oral-oral route is involved in childhood transmission. Moreover, *H. pylori* has a worldwide prevalence and is reported more frequently in developing countries. Besides gastrointestinal diseases, there is evidence suggesting *H. pylori* involvement in ITP [6].

Host antibodies against cytotoxin-associated gene A (Cag A), which is a virulence factor of *H. pylori* can increase the rate of platelet clearance due to mimicry between Cag A and platelet associated IgG. In addition to specific antibodies, down regulation of monocyte FcR receptors may shift the balance toward the increased phagocytic activity of monocytes, which may ultimately lead to thrombocytopenia [7].

Various antibiotics and proton pump inhibitors are widely used for the treatment of *H. pylori*. Several

recent reviews of previously published studies have shown that the eradication of *H. pylori* infection in patients with chronic ITP improved thrombocytopenia in about half of the cases [8].

We aimed to detect the association between *H. pylori* infection and ITP in children and adolescents.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This cross-sectional study was conducted in ninety-five patients who were recruited from the Hematology Unit, Department of Pediatrics, Menoufia University Hospital. The study was carried out in the period from June 2021 to June 2022, to explore the prevalence of *H. pylori* among ITP children. There were 55 male and 40 female patients aged from 3.5 to 7.5 years. Full history taking was carried out, the results of physical and clinical examination were recorded. The study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine, Menoufia University. An informed consent was obtained from caregivers of the patients prior to the recruitment.

Inclusion criteria:

1) children who were diagnosed with ITP based on the criteria of the American Society of Hematology (ASH) (the initial platelet count $< 100\ 000/\text{mm}^3$, normal Hb% and total leukocyte count) [9];

2) children who were reported positive for *H. pylori*;

3) Signed informed consent.

Children with other causes of thrombocytopenia such as; HCV, HBV, or HIV, drugs, lymphoproliferative disorders, other auto-immune disorders, and children with active life-threatening bleeding at the time of recruitment were excluded.

Sample collection and assay

Complete blood count (blood film, cell morphology and reticulocyte count) was performed at the time of presentation. Complete blood count was carried out using Sysmex KX21 automated hematology analyzer, Japan. During follow up, manual platelet count was performed: after 48 hours, one week, one month, three months, six months, 1 year (in patients who completed 1 year of follow up), before and after treatment of *H. pylori* (in patients positive for *H. pylori* antigen in stool).

H. pylori stool antigen test was performed in all cases, then the test was repeated for *H. pylori*-positive children 6 weeks after receiving treatment of *H. pylori*. Patients were asked to collect a specimen from their stool. Stool samples were stored at -20°C until use. The stool specimens were analyzed for *H. pylori* antigen. A commercial kit, DRG® *H. pylori* Ag (stool) ELISA (EIA-4354) was used as described

by its manufacturer. Two procedures are available: a quantitative method able to provide a quantification of *H. pylori* Ag in the specimen and a qualitative method.

Statistical analysis

The data were analyzed by SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 20 (SPSS Inc. IBM SPSS statistics for windows, version 20.0, Armonk, NY: IBM Corp). Descriptive statistics were calculated as percentage (%), mean and standard deviation (SD) for each variable. The Chi-squared test (χ^2) was used to study the association between two qualitative variables, and Fisher's exact test – to study the association between two qualitative variables. The Student's t-test was used for the comparison of two groups having normally distributed quantitative variables, and the Mann-Whitney test (non-parametric test) – for the comparison of two groups having not normally distributed quantitative variables. A *p*-value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The age of the children with ITP ranged from 3.5 to 7.5 years. Fifty-five of them were males and 40 were females. The majority of them recovered from ITP within three to six months from the initial presentation, regardless of treatment. The most common grade of bleeding at presentation was grade III. Most of the studied patients had skin bleeding either alone or associated with epistaxis or gum bleeding. Out of the studied ITP children, 62 (65.3%) were positive for *H. pylori* antigen in stool, and 33 of them (34.7%) were negative for *H. pylori* antigen in stool (table 1).

There is a statistically significant difference in the rate of recovery from ITP between *H. pylori*-negative patients (78.8%) in comparison to *H. pylori*-positive patients (22.6%). Also, as regards the rate of persistent ITP or chronic ITP; 35% of *H. pylori*-positive patients were diagnosed with chronic ITP, but only 6% of *H. pylori*-negative patients were diagnosed with chronic ITP. Thirteen percent of *H. pylori*-positive patients were diagnosed with persistent ITP, but only 1% of *H. pylori*-negative patients was diagnosed with persistent ITP (table 2).

There was no statistically significant difference in demographic characteristics (age at diagnosis and sex) among the studied ITP children regarding the presence of *H. pylori* antigen in stool. But there is a significant difference between *H. pylori*-positive and negative ITP children regarding the grade of bleeding at presentation; 51 (82.3%) *H. pylori*-positive ITP children presented with grade 3 bleeding, 35 (56.5%) of them presented with skin and gum bleeding, 16 (25.8%) – with skin bleeding and epistaxis (table 3).

During follow-up, platelet count was performed at different times after 1st-line of treatment and we found that there was no significant difference regarding the initial platelet count between *H. pylori* antigen positive or negative studied ITP children, however, a platelet count was significantly higher in *H. pylori*-negative ITP children in comparison to *H. pylori*-positive ones at 48 hours, one week, one month, 3 months, 6 months, and 1 year after 1st-line of treatment (table 4).

Regarding 1st-line treatment of ITP in the studied ITP children, 28 patients received high-dose dexamethasone only, 31 received oral prednisolone only, 29 received IVIG either followed by steroid therapy or not, and 7 patients did not require any treatment, with a spontaneous improvement during follow-up. In the studied group, 47 patients required 2nd-line treatment in the form of eltrombopag; either after treatment with oral prednisone or after treatment with high-dose dexamethasone (table 5).

There was a significant difference in the platelet count among *H. pylori*-positive ITP children after treatment of *H. pylori*; the median platelet count before treatment of *H. pylori* was $70 \times 10^3/\text{mm}^3$, after treatment – $109 \times 10^3/\text{mm}^3$ (table 6, figure).

After the eradication of *H. pylori* in *H. pylori*-positive ITP children, there was a significant rise of platelet count in all patients who received high-dose dexamethasone, oral prednisone and IVIG as 1st-line treatment, and eltrombopag as 2nd-line treatment respectively as shown in table 6.

DISCUSSION

In the present study, the age of children with ITP ranged from 3.5 to 7.5 years. Fifty-five of them were males and 40 were females. This age range and male predominance were similar to Abdollahi et al. [10] study. The majority of them recovered from ITP within three to six months from the initial presentation, regardless of treatment. This agreed with Akbayram et al. [11] who reported that 73.5% of patients completely resolved within 6 months after the onset of the disease and 26.5% of patients had progressed into chronic ITP.

The most common grade of bleeding at presentation was grade III. Most of the studied patients had skin bleeding either alone or associated with epistaxis or gum bleeding. This is in agreement with Zafar et al. [12] who reported that the vast majority of their patients presented had a clinically significant bleed that required medical treatment. This is in contrast to Bennett et al. [13] who reported that more than half of the patients had no or only mild bleeding. A reason might be that acute ITP is also treated by general pediatricians and only complicated cases are referred to pediatric hematologists/oncologists.

Table 1
Demographic and clinical characteristics of the studied ITP children

Characteristics	Studied ITP children (n = 95)
Age at diagnosis, years: mean ± SD median (IQR)	5.4 ± 2.3 5 (3.5–7.5)
Sex, n (%): male female	55 (57.9) 40 (42.1)
Types of ITP, n (%): recovered persistent chronic	41 (43.2) 14 (14.7) 40 (42.1)
Grade of bleeding, n (%): grade I grade II grade III	7 (7.4) 33 (34.7) 55 (57.9)
Type of bleeding, n (%): skin bleeding only skin and gum bleeding skin bleeding and epistaxis	40 (42.1) 39 (41.1) 16 (16.8)
<i>H. pylori</i> antigen in stool, n (%): positive negative	62 (65.3) 33 (34.7)

Note. Here and in tables 3, 4, 6: IQR – interquartile range.

Table 2
Types of ITP among the studied patients regarding *H. pylori* antigen in stool

Parameter	<i>H. pylori</i> antigen in stool among the studied ITP children, n (%)		χ^2 test	p-value
	Positive (n = 62)	Negative (n = 33)		
Types of ITP: recovered persistent chronic	14 (22.6) 13 (21.0) 35 (56.5)	26 (78.8) 1 (3.0) 6 (18.2)	28.17	< 0.001*

Note. Here and in tables 3, 4, 6: * – highly significant difference.

Table 3
Comparison of the demographic and clinical characteristics among the studied ITP children regarding *H. pylori* antigen

Characteristics	<i>H. pylori</i> antigen in stool among the studied ITP children		Test of significance	p-value
	Positive (n = 62)	Negative (n = 33)		
Age at diagnosis (median (IQR))	5 (3.5–8) years	4 (3.25–6.5) years	Mann–Whitney test = 1.61	0.11
Sex: male female	37 (59.7%) 25 (40.3%)	18 (54.5%) 15 (45.5%)	χ^2 test = 0.23	0.63
Grade of bleeding: grade I grade II grade III	0 (0%) 11 (17.7%) 51 (82.3%)	7 (21.2%) 22 (66.7%) 4 (12.1%)	χ^2 test = 46.29	< 0.001*
Type of bleeding: skin bleeding only skin and gum bleeding skin bleeding and epistaxis	11 (17.7%) 35 (56.5%) 16 (25.8%)	29 (87.9%) 4 (12.1%) 0 (0%)	χ^2 test = 43.99	< 0.001*

The prevalence of *H. pylori* infection among the patients in these studies were 20%, 90.47%, 66.2% respectively while in our study it was 62 cases (65.3%). In this study we found that out of the studied ITP

Table 4
Follow-up of platelet count among the studied ITP children regarding *H. pylori* antigen

Parameter	<i>H. pylori</i> antigen in stool among the studied ITP children		Test of significance	p-value
	Positive (n = 62)	Negative (n = 33)		
Platelet count at presentation (mean ± SD), × 10 ³ /mm ³	10.4 ± 2.5	9 ± 3.0	t-test = 0.67	0.39
Platelet count after 48 hours from treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	45 (39–50)	99 (90–105)	Mann–Whitney test = 6.82	< 0.001*
Platelet count after the 1 st week of treatment (mean ± SD), × 10 ³ /mm ³	132.3 ± 26.0	233.4 ± 46.7	t-test = 11.52	< 0.001*
Platelet count after the 1 st month of treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	107.5 (79.7–135)	250 (205–260)	Mann–Whitney test = 6.26	< 0.001*
Platelet count after the 3 rd month of treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	35 (25–91.2)	250 (225–285)	Mann–Whitney test = 6.30	< 0.001*
Platelet count after the 6 th month of treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	62.5 (45–96.2)	270 (230–300)	Mann–Whitney test = 6.45	< 0.001*
Platelet count after the 1 st year of treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	70 (55.5–97.5)	290 (250–300)	Mann–Whitney test = 6.27	< 0.001*

Table 5
Lines of treatment among ITP children regarding *H. pylori* antigen

Parameter	<i>H. pylori</i> antigen in stool among the studied ITP children, n (%)		Test of significance	p-value
	Positive (n = 62)	Negative (n = 33)		
Treatment:				
high dose of dexamethasone only (24 mg/m ² /day/4 days) (1–4 courses)	19 (30.6)	9 (27.3)	χ ² test = 11.88	0.03*
high dose of dexamethasone and IVIG	13 (21.0)	3 (9.1)		
oral prednisone only (2–4 mg/kg/day/1 week) followed by withdrawal over 1 week	21 (33.9)	10 (30.3)		
oral prednisone and IVIG	8 (12.9)	4 (12.1)		
IVIG only (1–2 gm/kg/dose)	0 (0.0)	1 (3.0)		
observation only	1 (1.6)	6 (18.2)		
Second-line treatment (Eltrombopag):				
high dose of dexamethasone and Eltrombopag (25–75 mg per day)	21 (50.0%)	1 (20.0%)	Fisher's exact test = 1.61	0.35
oral prednisone and Eltrombopag (25–75 mg per day)	21 (50.0%)	4 (80.0%)		

Note. * – significant difference.

Table 6
Comparison of platelet count before and after *H. pylori* treatment among *H. pylori*-positive ITP children

Parameter	<i>H. pylori</i> -positive ITP children (n = 62)	Test of significance	p-value
Platelet count before <i>H. pylori</i> treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	70 (60–95)	–	–
Platelet count after <i>H. pylori</i> treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	109 (95–151.2)	Wilcoxon signed- rank test = 6.79	< 0.001*
Parameter	ITP children who received high-dose dexamethasone	Test of significance	p-value
Platelet count before <i>H. pylori</i> treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	70 (56.2–108.7)	–	–
Platelet count after <i>H. pylori</i> treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	105 (90–180)	Wilcoxon signed- rank test = 4.86	< 0.001*
Parameter	ITP children who received oral prednisone	Test of significance	p-value
Platelet count before <i>H. pylori</i> treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	70 (60–95)	–	–
Platelet count after <i>H. pylori</i> treatment (median (IQR)), × 10 ³ /mm ³	120 (95–150)	Wilcoxon signed- rank test = 4.68	< 0.001*
Parameter	ITP children who received Eltrombopag	Test of significance	p-value
Platelet count before <i>H. pylori</i> treatment (mean ± SD), × 10 ³ /mm ³	64.3 ± 19.9	–	–
Platelet count after <i>H. pylori</i> treatment (mean ± SD), × 10 ³ /mm ³	100.7 ± 27.6	Paired t-test = 15.78	< 0.001*

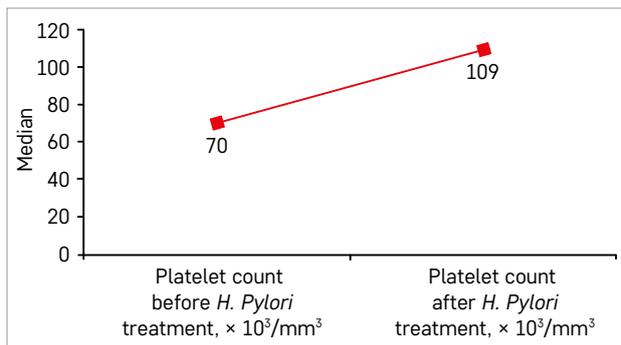
children, 62 patients (65.3%) were positive for *H. pylori* antigen in stool, 33 patients (34.7%) were negative for *H. pylori* antigen in stool.

These differences likely reflect the variation in the prevalence of *H. pylori* infection in the general

populations of different countries, which is higher in developing countries and lower in developed countries. Previous reports in children with chronic idiopathic thrombocytopenia showed a different prevalence rate of *H. pylori* infection among countries, ranging from 0%

Figure

A comparison of platelet count before and after *H. pylori* treatment among *H. pylori*-positive ITP children



in Finland to 6.4% in the Netherlands, 12.9% in Iran, 20% in Japan, 20.5% in Italy, 29.1% in Thailand, 31.4% in Turkey, and 40.9% in Taiwan [14].

Abdollahi et al. [10] showed that the percentage of *H. pylori*-Ag positive children in the case group was 90.47% while in the control group, it was 28.12% and Ahmed et al. [15]; illustrated that the percentage of ITP children with *H. pylori* infection in the patient group was 66.2% while in the control group, it was 29.8%. These results supported the association between *H. pylori* infection and ITP.

There is a statistically significant difference in the rate of recovery of ITP between *H. pylori*-negative patients (78.8%) in comparison with *H. pylori*-positive patients (22.6%). According to the rate of persistent ITP or chronic ITP; 35% of *H. pylori*-positive patients were diagnosed with chronic ITP, but only 6% of *H. pylori*-negative patients were diagnosed with chronic ITP. Thirteen percent of *H. pylori*-positive patients were diagnosed with persistent ITP, but only 1% of *H. pylori*-negative patients was diagnosed with persistent ITP.

This is in contrast to Jaing et al. [16] who reported that neither the response to corticosteroids, nor the final outcome was influenced by the *H. pylori* status in 63 patients with newly diagnosed ITP but stated that there was a positive association between *H. pylori* infection and chronic ITP. Also, Cheng et al. [17] reported that there was no significant difference in the remission rate between the ITP children with *H. pylori* infection and those without *H. pylori* infection in the same age group [16, 17].

There was no statistically significant difference in demographic characteristics (age at diagnosis and sex) among the studied ITP children regarding the presence of *H. pylori* antigen in stool. Ahmed et al. [15] reported no difference in gender, age between *H. pylori*-positive and negative ITP patients.

But in our study, there was a statistically significant difference between *H. pylori*-positive and negative ITP children regarding the grade of bleeding at presentation; 51 (82.3%) *H. pylori*-positive ITP children

presented with grade III bleeding, 35 (56.5%) of them – with skin and gum bleeding, 16 (25.8%) – with skin bleeding and epistaxis. Regarding all tested parameters other than the platelet count, there was no significant statistical difference between children at presentation.

Ikuse et al. [1] defined ITP as an immune-mediated acquired disease characterized by thrombocytopenia (peripheral blood platelet count < 100,000/ μ L with normal white blood cell count and hemoglobin level), in the absence of other causes or disorders that may be associated with thrombocytopenia.

During follow-up, platelet count platelet count was performed at different times after 1st-line of treatment and we found that there was no significant difference regarding the initial platelet count between *H. pylori*-Ag positive or negative studied ITP children, however, a platelet count was significantly higher in *H. pylori*-negative ITP children in comparison to *H. pylori*-positive ones at 48 hours, one week, one month, 3 months, 6 months, 1 year after 1st-line of treatment.

This is in agreement with Hodeib et al. [9] who reported that the platelet count was statistically significant higher among *H. pylori* stool antigen (HpSA)-negative children than HpSA-positive children.

In spite of different lines of treatment used in our study for the treatment of ITP, there was a significant difference in the platelet count among *H. pylori*-positive ITP children after treatment of *H. pylori*; the median platelet count before treatment of *H. pylori* was 70 $\times 10^3/\text{mm}^3$, after treatment, it was 109 $\times 10^3/\text{mm}^3$.

Hodeib et al. [9] reported that there was a significant rise in the mean platelet count in *H. pylori*-positive children from $70.6 \pm 4.8 \times 10^3/\text{mm}^3$ to $110.8 \pm 15.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ after *H. pylori* eradication therapy.

After the eradication of *H. pylori* in *H. pylori*-positive ITP children, there was a significant rise of platelet count in all patients who received high-dose dexamethasone, oral prednisone and IVIG as 1st-line of treatment, and eltrombopag as 2nd-line of treatment, respectively. This is in agreement with Pezeshki et al. [20], who reported that several meta-analyses and random clinical trials have already reported a positive outcome of *H. pylori* eradication on the platelet count of patients with ITP. For instance, the systemic reviews and meta-analyses of seventeen studies involving 788 ITP patients showed statistically significant increases in platelet counts in successfully eradicated patients compared to controls, and untreated and non-eradicated patients [21].

CONCLUSION

The prevalence of *H. pylori* infection among ITP pediatric patients was 65.3%. There was a significant

response in the platelet count among *H. pylori*-positive ITP children after treatment of *H. pylori*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to the participants of this study.

FUNDING

Not specified.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Ikuse T., Toda M., Kashiwagi K., Maruyama K., Nagata M., Tokushima K., et al. Efficacy of *Helicobacter pylori* Eradication Therapy on Platelet Recovery in Pediatric Immune Thrombocytopenic Purpura-Case Series and a Systematic Review. *Microorganisms* 2020; 8 (10): 1457.
- Kim B.J., Kim H.S., Jang H.J., Kim J.H. *Helicobacter pylori* eradication in idiopathic thrombocytopenic purpura: a meta-analysis of randomized trials. *Gastroenterol Res Pract* 2018; 2018: 6090878, 1–8.
- D’Orazio J.A., Neely J., Farhoudi N. ITP in Children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35: 1–13.
- Consolini R., Renee Forbes L., Wahlstrom J., Pignata C., Giardino G., Gallo V. Unbalanced immune system: immunodeficiencies and autoimmunity. *Front Paediatr* 2016; 4: 1–9.
- Ghanima W., Godeau B., Cines D.B., Bussel J.B. How I treat immune thrombocytopenia: the choice between splenectomy or a medical therapy as a second-line treatment. *Blood* 2012; 120 (5): 960–9.
- Mentis A., Lehours P., Mégraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2015; 20: 1–7.
- Eghbali A., Siavashan V.R., Bagheri B., Afzal R.R. Impact of *Helicobacter pylori* Eradication in Children with Acute Immune Thrombocytopenia: A Randomized Controlled Study. *Arch Pediatr Infect Dis* 2019; (7): 98–102.
- Frydman G.H., Davis N., Beck P.L., Fox J.G. *Helicobacter pylori* eradication in patients with immune thrombocytopenic purpura: a review and the role of biogeography. *Helicobacter* 2015; 20 (4): 239–51.
- Hodeib M.M., Ali A.G., Kamel N.M., Senosy S.A., Fahmy E.M., Abdelsadik A., et al. Impact of eradication therapy of *Helicobacter pylori* in children with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Egyptian Pediatric Association Gazette* 2021; 69 (1): 1–4.
- Abdollahi A., Shoar S., Ghasemi S., Zohreh O.Y. Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for idiopathic thrombocytopenic purpura in children? *Ann Afr Med* 2015; 14 (4): 177–81.
- Akbarbayram S., Dogan M., Ustyoil L., Akgun C., Peker E., Bilici S., et al. The clinical outcome of 260 pediatric ITP patients in one center. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011; 17 (6): E30–5.
- Zafar H., Anwar S., Faizan M., Riaz S. Clinical features and outcome in paediatric newly diagnosed immune thrombocytopenic purpura in a tertiary care centre. *Pak J Med Sci* 2018; 34 (5): 1195–9.
- Bennett C.M., Neunert C., Grace R.F., Buchanan G., Imbach P., Vesely S.K., et al. Predictors of remission in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia: Data from the Intercontinental Cooperative ITP Study Group Registry II participants. *Pediatr Blood Cancer* 2018; 65 (1): e26736.
- Hooi J.K.Y., Lai W.Y., Ng W.K., Suen M.M.Y., Underwood F.E., Tanyingoh D., et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2017; 153 (2): 420–9. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.04.022
- Ahmed A.Z., Radwan A.M., Rizk H.L. The Role of *Helicobacter Pylori* Infection in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Children. *Egyptian Journal of Hospital Medicine* 2021; 82 (2): 193–8.
- Jaing T.H., Tsay P.K., Hung I.J., Chiu C.H., Yang C.P., Huang I.A. The role of *Helicobacter pylori* infection in children with acute immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47 (2): 215–7.
- Cheng Y.Y., Xiong H., Xu Z.L., Li J.X., Li H., Cai W., et al. Association between *Helicobacter pylori* infection and newly diagnosed childhood immune thrombocytopenia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2015; 17 (1): 22–5.
- Stasi R., Sarpatwari A., Segal J.B., Osborn J., Evangelista M.L., Cooper N., et al. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood* 2009; 113 (6): 1231–40.
- Noonavath R.N., Lakshmi C.P., Dutta T.K., Kate V. *Helicobacter pylori* eradication in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (22): 6918–23.
- Pezeshki S.M.S., Saki N., Ghandali M.V., Ekrami A., Avarvand A.Y. Effect of *Helicobacter Pylori* eradication on patients with ITP: a meta-analysis of studies conducted in the Middle East. *Blood Res* 2021; 56 (1): 38–43.
- Franchini M., Cruciani M., Mengoli C., Pizzolo G., Veneri D. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet count in idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review and metaanalysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 237–46.

Association between the levels of serum vitamin D and trace elements and joint health in children with hemophilia

Seham M. Ragab¹, Alzahraa E.A. Sharaf², Noha R.M. Bayomy¹, Beshoy S.T. Abdel Nour³, Asmaa A. Mahmoud¹

¹Menoufia University, Menoufia, Egypt

²Sohag University, Egypt

³Sohag Health Insurance Hospital, Egypt

Correspondence:

Asmaa Abdel Sameea Mahmoud,
 Assistant Professor of Pediatrics,
 Faculty of Medicine, Menoufia University
 Hospital, Shebin El Kom, Egypt
 Address: Yassin Abdel-Ghafar St.,
 Shebin El Kom, 32511 Menoufia, Egypt
 E-mail: asmaasoliman50@gmail.com

Hemophilia is defined as X-linked recessive bleeding disorder. Recurrent bleeding episodes lead to hemarthrosis. Objectives: to investigate the levels of serum 25(OH) D and trace elements in children with hemophilia A and B and to identify the possible association of these factors with Hemophilia Joint Health Score (HJHS). This case-control study was conducted among children with hemophilia A and B. A total of 48 cases were recruited from the hematology units at the Menoufia University Hospital ($n = 36$) and Sohag University Hospital ($n = 12$) from December 2020 to February 2022. Forty healthy controls were matched to cases on age, sex and socioeconomic status. Serum zinc and magnesium levels in the hemophilia patients were significantly lower than in the controls, while serum alkaline phosphatase levels in the cases were significantly higher than in the controls. Informed consent was obtained from all the children's parents and ethical approval was acquired from the ethical committee (ID: 5/2020PEDI38), Faculty of Medicine, Menoufia University. The levels of phosphorus and calcium were the same in two groups. Serum 25(OH) D levels were deficient in 85.4% of the cases and insufficient in 14.6%. None of the hemophilia patients had sufficient levels of serum 25(OH) D. There was no significant correlation between HJHS and the levels of serum trace elements but there was a significant positive correlation between HJHS and annualized bleeding rate and a significant negative correlation between HJHS and serum vitamin D. There was no significant difference regarding the demographic data except for weight and body mass index. The patients had significantly higher weight and body mass index compared to the control group. The levels of serum vitamin D and trace elements were decreased in hemophilia patients, and these low values were associated with the worst joint health.

Key words: hemarthrosis, Hemophilia Joint Health Score, hemophilia, target joint, vitamin D

Seham M. Ragab, et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 74–9.
 DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-74-79

Hemophilia is an X-linked genetic coagulopathy with an estimated frequency of 1 in 10,000 people. The most prevalent types of hemophilia are factor VIII deficiency, or hemophilia A, which accounts for about 80% of all cases, and factor IX deficiency, or hemophilia B, which accounts for about 20% of cases [1]. Depending on residual endogenous levels of FVIII/FIX, patients with factor levels < 1 IU/dL are classified as having severe hemophilia and account for almost half of all cases; those with factor levels of 1–5 IU/dL and > 5 IU/dL have moderate and mild hemophilia, respectively. Even in patients with severe hemophilia, the bleeding phenotype may vary [2]. Clinical signs include abrupt bleeding throughout the body, especially in the joints and muscles. Other problems such as arthropathy are frequent complications of bleeding episodes [3]. The frequency of hemarthrosis in people with hemophilia ranges between 75 and 90%, with ankles and knees being the most affected joints [4]. The fear of bleeding reduces mobility and weight-bearing activity, which leads to decreased bone mineral density (BMD) [5]. Long-term immobility as well as hepatitis C virus and human

immunodeficiency virus are predisposing factors that reduce BMD. Chronic inflammation associated with chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infection has deleterious effect on bone metabolism leading to the modulation of the bone-remodeling pathway through pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-17 that can promote the differentiation of osteoclast from their precursor cells. This results in imbalance between bone resorption and bone formation leading to osteoporosis and fractures [6]. Subclinical deficiencies of vitamin D, magnesium (Mg), and zinc (Zn) are also linked to reduced BMD and osteoporosis [7]. Few researches have discussed the significance of vitamin D in children with hemophilia, and their findings and conclusions considering vitamin D in children with hemophilia are unreliable. Even though some researchers observed reduced 25(OH) D levels in hemophilia cases compared to healthy controls, others found no difference [8]. The aim of our study was to investigate serum levels of 25(OH) D and some trace elements such as calcium (Ca), phosphorus (P), Zn and Mg in children with hemophilia A and B and to detect

the possible association of these factors with Hemophilia Joint Health Score (HJHS).

MATERIALS AND METHODS

This case-control study included 48 patients with hemophilia A and B who were recruited from the hematology units at the Menoufia University hospital ($n = 36$) and Sohag University hospital ($n = 12$) from December 2020 to February 2022 and 40 healthy controls who were matched to cases on age, sex, and socioeconomic status. Hemophilia cases were categorized according to the severity of their disease into mild (plasma factor levels > 5 IU/dL), moderate (1–5 IU/dL), and severe (< 1 IU/dL). All the subjects' medical histories were retrieved from the general questionnaire via in-person interviews. Informed consent was obtained from all the children's parents and ethical approval was acquired from the ethical committee (ID: 5/2020PEDI38), Faculty of Medicine, Menoufia University. To detect joint impairment, the HJHS version 2.1 was utilized. The HJHS comprises an assessment of the following features or items of the index joints (elbows, knees, and ankles): swelling, duration of swelling, crepitus on motion, muscle atrophy, extension and flexion loss, joint pain, strength, and global gait. The HJHS total score is calculated by adding the joint total scores to the global gait score. A total score of 0 represents the ideal joint health, while 124 indicates the worst joint health [9].

Blood samples (5 mL) were collected after 8–12 hours of overnight fast. After centrifugation, blood samples were kept at -80°C until laboratory analysis. To assess vitamin D status, serum 25(OH) D₃ concentration was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); alkaline phosphatase (ALP), serum Ca, Mg, Zn, and P levels were measured using a colorimetric method. The quantitative determination of vitamin D (SunRed Biotechnology Company ELISA kits, Infinite F50 Tecan, Austria GmbH): a double-antibody sandwich ELISA was used to determine the concentration of human 25-dihydroxy vitamin D₃ (25(OH) D₃). Zn concentration was measured using a colorimetric method: Zn in the specimen is chelated by zincon (2-carboxy-2'-hydroxy-5-Sulfoformazyl-benzene) in the reagent at alkaline pH. The formation of the complex is measured at 610 nm wavelength. In an alkaline solution, Mg ions combine with the metallochromic dye calmagite to form a chromophore which absorbs at 520 nm. Ca is excluded from the reaction by forming a compound with ethylene glycol bis (β-aminoethyl ether) – N, N tetracetic acid (EGTA). Inorganic phosphorous (which is present in serum as phosphate) forms a phosphomolybdate complex with molybdic acid. This complex is reduced by stannous chloride to a blue tint that may be measured colorimetrically. Assay system

employs formic acid as a protein solubilizer and glycerol as a stabilizer. At pH 8.5, Arsenazo III (2, 2- [1, 8-Dihydroxy-3, 6-disulpho-bis (azo)] di benzene arsenic acid) reacts with Ca ions to form a colored complex. The strength of the resulting color is proportional to the Ca concentration in the sample.

Sample size estimation

Sample size was calculated by using the following formula: $N = (Z\alpha + Z\beta)/C^2 + 3$, at a power of 0.8 and a confidence interval of 95%. The sample size was estimated to be 45 subjects.

Statistical analysis

The data were collected and analyzed using SPSS software (Statistical Package for the Social Science, version 20; IBM Armonk, New York). Numeric data were presented as mean \pm SD and compared using the Student t-test. Non-numeric data were presented as frequency or percentage and compared using a Chi-square test (χ^2). Correlation analysis (using Pearson's method) was applied for measurement the strength of association between two quantitative variables. The correlation coefficient (r) measures the strength and direction of the linear relationship between two variables. A p -value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Demographic and anthropometric data, as well as the type and severity of the disease are provided in *table 1*. The mean level of vitamin D was significantly lower in the cases than in the controls. The majority of hemophilia patients (85.4%) had deficient levels of vitamin D and none of them had sufficient levels, whereas the majority of healthy controls (65%) had sufficient levels of vitamin D. The hemophilia patients had significantly lower serum levels of Mg, Zn and significantly higher serum ALP levels in comparison to the control group. Both groups showed no significant differences in the levels of total serum Ca, ionized Ca and P ($p > 0.05$). The most common complications in the patients with hemophilia were hemarthrosis (97.9%) and bone pain (52.1%). Iliopsoas and gluteal muscle hematoma occurred in three patients. One patient had calf muscle hematoma. Intracranial hemorrhage occurred in one patient (*table 2*).

There were insignificant differences in the levels of serum vitamin D and other trace minerals between the patients with mild and moderate disease and those with severe disease ($p > 0.05$) as presented in *table 3*. It was noticed that the majority of both groups had insufficient levels of vitamin D.

There was a significant positive correlation between the serum vitamin D and ionized Ca levels

Table 1
Demographic and anthropometric data of the cases and controls

Demographic data	Patients (n = 48)	Controls (n = 40)	p-value
Age, years	9.78 ± 3.66	8.11 ± 3.35	0.21
Male sex, n (%)	48 (100)	40 (100)	–
Weight, kg	31.39 ± 10.78 30 (24.25–35.75)	24.00 ± 9.99 25.0 (14.0–31.5)	0.001
Weight percentile, n (%):			
< 5 th percentile	3 (6.3)	1 (2.5)	0.907
normal	44 (91.7)	38 (95.5)	
> 95 th percentile	1 (2.1)	1 (2.5)	
Height, cm	129.14 ± 20.98	122.03 ± 21.09	0.117
Height percentile, n (%):			
< 5 th percentile	7 (14.6)	3 (7.5)	0.24
normal	41 (85.4)	37 (92.5)	
BMI, kg/m ²	18.38 ± 2.54	16.51 ± 5.11	0.028
Class of BMI, n (%):			
underweight	21 (43.8)	18 (45)	0.449
normal	26 (54.2)	22 (55.0)	
overweight	1 (2.1)	0 (0.0)	
Type of hemophilia and disease severity (n = 48)			
Type of hemophilia, n (%):			
hemophilia A		45 (93.8)	
hemophilia B		3 (6.2)	
Disease severity according to factor level, n (%):			
mild > 5%		1 (2.1)	0.449
moderate 1–5%		6 (12.5)	
severe < 1%		41 (85.4)	

Note. The data are expressed as frequency (percentage), mean (SD), range. p-value < 0.05 was considered significant.

Table 2
Levels of serum vitamin D and trace elements in the patients and controls

Parameter	Patients (n = 48)	Controls (n = 40)	p-value
Vitamin D, ng/mL	14.99 ± 5.58	36.76 ± 15.55	< 0.001
Level of vitamin D, n (%):			
sufficient > 30 ng/mL	0 (0.0)	26 (65)	< 0.001
insufficient 20–30 ng/mL	7 (14.6)	9 (22.5)	
deficient < 20 ng/mL	41 (85.4)	5 (12.5)	
Total Ca, mg/dL	8.85 ± 0.60	8.89 ± 0.43	0.09
Ionized Ca, mg/dL	1.22 ± 0.22	1.23 ± 0.11	0.56
ALP, U/L	223.01 ± 54.24	175.11 ± 59.45	< 0.001
Serum Mg, mmol/L	0.39 ± 0.25	0.61 ± 0.23	< 0.001
Serum Zn, mg/dL	95.79 ± 29.08	170.11 ± 51.34	< 0.001
Serum P, mg/dL	2.45 ± 2.14	2.89 ± 2.11	0.43
Complications and HJHS in the hemophilia patients			
Hemarthrosis, n (%)		47 (97.9)	
Bone pain, n (%)		25 (52.1)	
Iliopsoas muscle hematoma, n (%)		3 (6.3)	
Gluteal muscle hematoma, n (%)		3 (6.3)	
Calf muscle hematoma, n (%)		1 (2.1)	
Intracranial hemorrhage, n (%)		1 (2.1)	
HJHS		50.02 ± 21.04	

Note. The data are expressed as mean (SD). P-value < 0.05 was considered significant.

($r = 0.33$, $p = 0.03$), a significant negative correlation between the serum vitamin D and ALP levels and between the total serum Ca concentration and annualized bleeding ratio (ABR). We found a significant negative correlation between HJHS score and serum vitamin D levels ($r = -0.31$, $p = 0.03$) and a significant positive correlation between HJHS score and ABR ($r = 0.73$, $p = 0.001$) (table 4 and figure).

DISCUSSION

In our study, there was no significant difference in age between the patients and controls (9.78 ± 3.66 y.o. vs 8.11 ± 3.35 y.o.), sex (all participants were males) and height (129.14 ± 20.98 cm vs 122.03 ± 21.09 cm), but there was difference in weight and body mass index (BMI). The patients had significantly higher weight and BMI than the controls. Twenty-six (54.2%) of the studied patients and 21 (55%) of the controls had normal BMI. Twenty-one (43.8%) patients and 18 (45%) controls were underweight. One subject in each group was considered overweight. The weight and height of

Table 3
Levels of vitamin D and trace elements in the hemophilia patients according to the disease severity

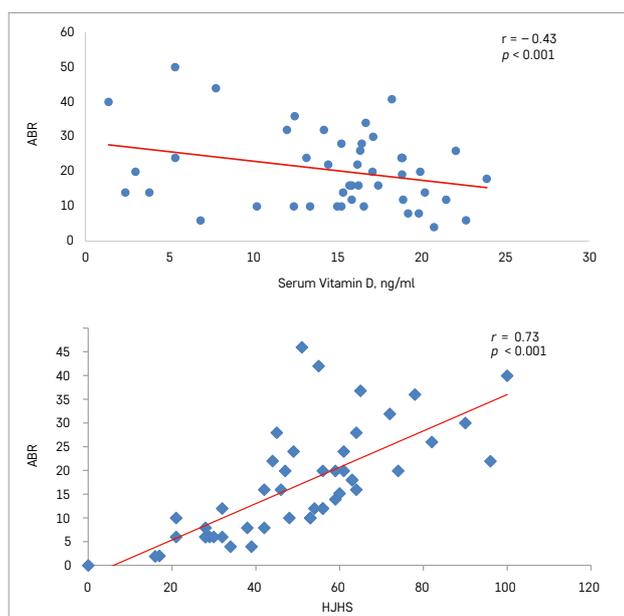
Vitamin D and trace elements	Severity of hemophilia		p-value
	Mild and moderate (n = 7)	Severe (n = 41)	
Vitamin D, ng/mL	15.84 ± 6.54	14.85 ± 5.48	0.66
Level of vitamin D, n (%):			
insufficient 20–30 ng/mL	2 (28.6)	5 (12.2)	0.25
deficient < 20 ng/mL	5 (71.4)	36 (87.8)	
Total Ca, mg/dL	8.61 ± 0.62	8.89 ± 0.60	0.25
Ionized Ca, mg/dL	1.21 ± 0.24	1.22 ± 0.21	0.98
ALP, U/L	221.66 ± 76.45	223.24 ± 50.78	0.94
Serum Mg, mmol/L	0.50 ± 0.45	0.37 ± 0.21	0.22
Serum Zn, mg/dL	93.28 ± 27.42	96.22 ± 29.67	0.80
Serum P, mg/dL	3.87 ± 2.32	2.21 ± 2.04	0.06

Note. The data are expressed as mean (SD). p-value < 0.05 was considered significant.

Table 4
Correlation between the level of vitamin D and other parameters in the patients

Parameter	r-value	p-value
Total Ca	-0.09	0.53
Ionized Ca	0.33	0.03
ALP	-0.30	0.04
Serum Mg	-0.12	0.38
Serum Zn	0.15	0.29
Serum P	0.13	0.22
ABR	-0.43	< 0.001
Correlation between HJHS score and vitamin D and ABR in the studied patients		
Vitamin D	-0.31	0.03
ABR	0.73	< 0.001

Figure
Correlation between vitamin D and ABR (A), HJHS and ABR (B)



the majority of cases and controls were between the 5th and 95th percentile (normal). Abbasnezhad et al. [10] reported that there were insignificant differences in age, weight, BMI, and sociodemographic characteristics. Badr et al. [11] reported that among the studied hemophilia patients (30 males) age ranged from 6 to 22 years, the mean BMI was 20.98 ± 8.29 , 50% of the studied cases were of healthy weight and 13.3% of them were obese.

As for the type of hemophilia, the majority (93.8%) of our cases had hemophilia A, and only three cases had hemophilia B. As for the severity of hemophilia, our study showed that only one (2.1%) patient had mild disease, 6 (12.5%) patients had moderate disease, and most (85.4%) of the patients had severe disease. Rodriguez-Santana et al. [12] reported that 79% of their patients had hemophilia A and 58% had severe hemophilia. The majority of the cases (82%) had no comorbidities and 77% of the patients had 1 to 5 bleeds per year. Payal et al. [1] reported that, out of a total of 56 cases, 51 (91.07%) cases were diagnosed with hemophilia A, and 5 cases (8.92%) were diagnosed with hemophilia B. According to the factor level, 25 (44%) cases had severe disease, 20 (36%) had moderate disease, and 11 (20%) had mild disease. In the study by Varghese and Padmakumar [13], factor VIII deficiency was found in 30 (75%) cases (hemophilia A), while 10 (25%) cases had Factor IX deficiency (hemophilia B). The majority of these cases had severe deficiency.

In our study, the most common clinical presentations among hemophilia patients were bleeding after circumcision (35.4%), joint bleeding (97.7%) and easy bruising (20.8%). Two patients had epistaxis. Dental bleeding, hematuria, hematemesis, and wound bleeding occurred

in one patient each. In our study, the mean annualized bleeding rate (ABR) was 20.56. Payal et al. [1] reported that, post-traumatic bleeding was the first clinical manifestation in 20 (36%) cases; the mean number of bleeds per year was 6.5 ± 9 . Thirty cases (53.57%) had 1–5 episodes of joint bleeding in the last year. Four (7.14%) cases had more than 10 bleeding episodes. The median number of joint bleedings was 3 ± 5 . Dorgalaleh et al. [14] found that, the most common clinical manifestations were hemarthrosis, epistaxis, ecchymosis, and post-dental extraction hemorrhage.

Oldenburg et al. [15] reported the model-based ABR and the median ABR for all bleeds in the episodic and prophylactic groups. Patel et al. [16] reported that after treatment the median number of joint bleeding events per six months reduced to 4 and the percentage of patients with target joints dropped to 42.1% (16 cases). The median number of target joints reduced from 6 to 1, and the median total joint range of motion score decreased from 16 to 5. Linari et al. [17] reported that the mean ABR was insignificantly higher in hemophilia A patients than in hemophilia B patients. Nevertheless, a significant correlation was discovered between ABR and the type and severity of hemophilia.

Young et al. [18] reported that in their study 46.4% of study subjects had no bleeding episodes.

There were no significant differences in CBC parameters between the cases and controls in the present study.

In our study, the mean level of serum vitamin D was significantly lower in the hemophilia patients than in the controls. The majority (85.4%) of the hemophilia patients had vitamin D deficiency and none of them had sufficient vitamin D levels. In contrast, the majority (65%) of the controls had sufficient vitamin D levels.

Albayrak and Albayrak [19] noted that blood vitamin D in children with hemophilia was considerably lower in winter and fall than in summer. The majority of hemophilia patients included in their study (96%) had insufficient vitamin D levels.

In the study by Alioglu et al. [20], the mean vitamin D levels were decreased in children with hemophilia when compared to controls. Ranta et al. [21] stated normal mean levels in hemophilia children with 50% insufficiency.

In the study by Eldash et al. [22], cases had considerably lower levels of Ca and vitamin D than healthy controls. Moderate and mild vitamin D deficiency was reported in 16 (43.2%) and 13 (35.1%) cases, respectively. Eight (21%) cases were shown to have normal vitamin D level.

Badr et al. [11] reported that the mean vitamin D level in the studied group was 18.13 ± 10.56 and 40% of hemophilia patients had severe deficiency of vitamin D. Abbasnezhad et al. [10] also reported that the number

of subjects with vitamin D deficiency was higher in the hemophilia group than in the control group. In our study, hemophilia patients had significantly lower concentrations of serum Mg and Zn and significantly higher ALP in comparison to healthy controls. However, both groups showed no significant differences regarding the total levels of serum Ca, ionized serum Ca and serum P. Badr et al. [11] measured serum Ca, Ph and ALP among hemophilia patients: the mean of serum Ca was 9.04 ± 1.26 , and the mean of serum ALP was 235.43 ± 73.54 . In the study conducted by Abbasnezhad et al. [10], the serum levels of Zn, P, and Mg were significantly lower in patients with hemophilia than in healthy controls.

The results obtained by Ghaniema et al. [23] are in line with our findings: serum Zn and Mg were lower in hemophilia patients than in healthy subjects, with no significant difference in serum Ca values. The most common complications among the studied hemophilia patients were hemarthrosis (97.9%) and bone pain (52.1%). Iliopsoas and gluteal muscle hematoma occurred in three patients. One patient had calf muscle hematoma. Intracranial hemorrhage occurred in one patient. There was a significant negative correlation between HJHS score and serum vitamin D levels.

In the study by Borhany et al. [24], the most common type of bleeding was hemarthrosis which occurred in 72.85% of patients, followed by hematoma (51.4%), post-circumcision bleeding (37.14%), bleeding after trauma (28.51%). Less common bleeding episodes were associated with hematuria, bruising, and gum bleeding. In the Kumar et al. [25] study, 40.50% of patients had joint swelling at least once in their life, most commonly affecting the knee joint. Sajid et al. [26] also reported that the knee joint was the most frequently affected joint (48%) and that in 36% of cases more than one joint was affected. Abbasnezhad et al. [10] showed a strong negative correlation between circulating 25(OH) D levels and HJHS score.

In our study, there were no significant differences in the levels of serum vitamin D and other trace elements among the patients with mild, moderate and severe disease. The majority of hemophilia patients had insufficient levels of serum vitamin D. Badr et al. [11] demonstrated that there was a significant difference in the mean levels of vitamin D, vitamin D status and the severity of hemophilia. Similarly, Sanadhya and Singh [27] found a significant correlation between serum vitamin D levels and the severity of hemophilia. In their study, 97.14% of patients with severe hemophilia had insufficient vitamin D level, so they concluded that the severity of vitamin D deficiency increases with higher severity of hemophilia.

Linari et al. [17] obtained similar results in their research. Albayrak and Albayrak [19] found high levels of vitamin D deficiency in children with hemophilia which demonstrates that hemophilia cases are prone

to vitamin D deficiency. Eldash et al. [22] proposed that elements associated with hemophilia may enhance the risk of vitamin D insufficiency in children with hemophilia. In their research there was a significant difference in vitamin D levels between hemophilia cases and controls and they suggested that this deficiency was caused by a combination of factors. Some of them may be attributable to a shorter exposure to sunlight, smaller area of exposure, and the depth of penetration. Reduced mobility and frequent hospitalizations due to arthropathy may also contribute to the deficit of sunlight. Rapid changes in Ca metabolism associated with patients' immobility and inactivity may also reduce vitamin D levels. We found that HJHS had no significant correlations with serum trace elements but it had a significant positive correlation with ABR. Abbasnezhad et al. [10] reported that serum concentrations of Zn, Mg and P had a negative association with HJHS, whereas serum Ca had no correlation with HJHS.

Ghaniema et al. [23] reported that in patients with hemophilia A blood levels of Zn were significantly negatively correlated with joint problems and the level of functional impairment. Serum levels of Mg showed no association with these factors, however. Alioglu et al. [20] found a strong negative correlation between serum 25(OH) D and total joint score in hemophilia patients. Young et al. [18] reported that in patients with one or more target joints at baseline, the median ABR for the 12 months before the study was 8.0.

As for the types of target joints, we found that there was no significant difference in the levels of vitamin D between patients with different target joints. In our study, 58.33% of the patients had only one target joint while 41.67% of patients had two or more target joints. Mishra et al. [28] found that the most common target joint was the knee (57.1% of cases). About 76% of patients had swollen joints resulting in restricted joint mobility. Bleeding in soft tissues and joints occurred 62.3% and 15.6% of patients, respectively. The percentage of severe hemophilia cases was higher in type A hemophilia patients.

CONCLUSION

The majority of our patients had severe hemophilia A. Most of them had deficient levels of vitamin D, significantly low levels of serum Mg and Zn and significantly high levels of ALP. HJHS had no significant correlations with the levels of serum trace elements, but it had a significant negative correlation with serum vitamin D and a positive correlation with annualized bleeding rate.

FUNDING

Not specified.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Payal V., Sharma P., Goyal V., Jora R., Parakh M., Payal D. Clinical profile of hemophilia patients in Jodhpur Region. *Asian J Transfusi Sci* 2016; 10 (1): 101–4.
2. Van Dijk K., Fischer K., Van Der Bom J.G., Grobbee D.E., Van den Berg H.M. Variability in clinical phenotype of severe hemophilia: The role of the first joint bleed. *Hemophilia* 2005; 11 (5): 438–43.
3. Gurcay E., Eksioğlu E., Ezer U., Tuncay R., Cakci A. Functional disability in children with hemophilic arthropathy. *Rheumatol Int* 2006; 26 (11): 1031–5.
4. Kashyap R., Choudhry V. Management of hemophilia in developing countries. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016; 32 (3): 347–55.
5. Lafeber F., Miossec P., Valentino L. Physiopathology of hemophilic arthropathy. *Hemophilia* 2008; 14 Suppl 4: 3–9.
6. Assarehzadegan M.A., Ghafourian Boroujerdnia M., Zandian K. Prevalence of hepatitis B and C infections and HCV genotypes among hemophilia patients in Ahvaz, Southwest Iran. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14 (8): 470–4.
7. Anagnostis P., Karras S., Paschou S.A., Goulis G.D. Hemophilia A and B as a cause for secondary osteoporosis and increased fracture risk. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; 26 (6): 599–603.
8. De la Corte-Rodriguez H., Rodriguez-Marchan E.C. The role of physical medicine and rehabilitation in haemophilic patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24: 1–9.
9. Hilliard P., Funk S., Zourikian N., Bergstrom M.B., Bradley S.C., McLimont M., et al. Hemophilia joint health score reliability study. *Hemophilia* 2006; 12 (5): 518–25.
10. Abbasnezhad A., Habibi M., Abdolkarimi B., Zare S., Moghadam E.F., Choghakhori R. Serum Concentrations of Vitamin D, Calcium, Phosphorus and Trace Minerals in Adults and Children with Hemophilia A: Association with Disease Severity, Quality of Life, Joint Health and Functional Status. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2020; 14 (1): 56–71.
11. Badr M.A., Mohamed M.Z., Sediq A.M., Mohammed T.M. Vitamin D Status and Risk of Osteoporosis in Hemophilia Patients. *World* 2022; 28 (3): 534–41.
12. Rodriguez-Santana I., DasMahapatra P., Burke T., Hakimi Z., Bartelt-Hofer J., Nazir J., et al. Health-related quality of life, direct medical and societal costs among children with moderate or severe hemophilia in Europe: multivariable models of the CHES-PAEDs study. *Orphanet J Rare Dis* 2022; 17 (1): 150.
13. Varghese S., Padmakumar N.N. Clinical profile of haemophilia in children in a tertiary care centre. *J Evol Med Dental Sci* 2017; 6 (82): 5775–8.
14. Dorgalaleh A., Dadashzadeh G., Bamedi T. Hemophilia in Iran. *Hematology* 2016; 21 (5): 300–10.
15. Oldenburg J., Shima M., Kruse-Jarres R., Santagostino E., Mahlangu J., Lehle M., et al. Outcomes in children with hemophilia A with inhibitors: results from a noninterventional study. *Pediatr Blood Cancer* 2020; 67 (10): e28474.
16. Patel G.R., Saxena R., Aggarwal S., Mahapatra M. Evaluation of bone mineral density (BMD) and the effect of type of factor replacement therapy on BMD in children with hemophilia: A single-center observational study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2022; 10: (1016).
17. Linari S., Montorzi G., Bartolozzi D., Borderi M., Melchiorre D., Benelli M. Hypovitaminosis D and osteopenia/osteoporosis in a haemophilia population: a study in HCV/HIV or HCV infected patients. *Hemophilia* 2013; 19 (1): 126–33.
18. Young G., Mahlangu J., Kulkarni R., Nolan B., Liesner R., Pasi J., et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein for the prevention and treatment of bleeding in children with severe hemophilia A. *J Thrombos Haemost* 2015; 13 (6): 967–77.
19. Albayrak C., Albayrak D. Vitamin D levels in children with severe hemophilia A: an underappreciated deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; 26 (3): 285–9.
20. Alioglu B., Selver B., Ozsoy H., Koca G., Ozdemir M., Dallar Y. Evaluation of bone mineral density in Turkish children with severe hemophilia A: Ankara hospital experience. *Haemophilia* 2012; 18 (1): 69–74.
21. Ranta S., Viljakainen H., Mäkiperna A., Mäkitie O. Hypercalciuria in children with haemophilia suggests primary skeletal pathology. *Br J Haematol* 2011; 153 (3): 364–71.
22. Eldash H.H., Atwa Z.T., Saad M.A. Vitamin D deficiency and osteoporosis in hemophilic children: an intermingled comorbidity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2017; 28 (1): 14–8.
23. Ghaniema E.M., Ahmed S.F., Amin I.R., Ayoub S.M. Evaluation of osteoporosis in hemophilic arthropathy patients: correlation with disease severity and serum trace minerals. *J Osteoporos* 2011; 2011: 106380.
24. Borhany M., Shamsi T., Naz A., Khan A., Parveen K., Ansari S., et al. Congenital bleeding disorders in Karachi, Pakistan. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011; 17 (6): E131–7.
25. Kumar S., Sinha S., Bharti A., Meena L.P., Gupta V., Shukla J. A study to determine the prevalence, clinical profile and incidence of formation of inhibitors in patients of hemophilia in North Eastern part of India. *J Family Med Prim Care* 2019; 8 (7): 2463.
26. Sajid R., Khalid S., Mazari N., Azhar W., Khurshid M. Clinical audit of inherited bleeding disorders in a developing country. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53: 50–3.
27. Sanadhya A., Singh J. Comparative study of vitamin D levels in hemophilia and healthy children. *IOSR-JDMS* 2016; 15 (6): 1–5.
28. Mishra S., Kumar S., Panwar A., Bhagchandani D., Aneja G.K., Verma N., et al. A clinical profile of hemophilia patients and assessment of their quality of life in Western Uttar Pradesh, India: An observational study. *Med JI of Dr. DY Patil University* 2016; 9 (3): 320.
29. Mutlu M., Argun M., Kilic E., Saraymen P., Yazar S. Magnesium, zinc and copper status in osteoporotic, osteopenic and normal post-menopausal women. *J Int Med Res* 2007; 35 (5): 692–5.
30. Backström M.C., Kouri T., Kuusela A.L., Sievänen H., Koivisto M.A., Mäki M., et al. Bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase and serum inorganic phosphate in metabolic bone disease of prematurity. *Acta Paediatr* 2000; 89 (7): 867–73.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 31.01.2023
Принята к печати 28.04.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-80-86

Количественная магнитно-резонансная томография костного мозга у пациентов с острым лимфобластным лейкозом

Г.В. Терещенко, Н.А. Кривенцова, Д.А. Куприянов, М.И. Абу Джабал, А.Д. Копанева, Н.В. Мякова, Д.В. Литвинов, А.И. Карачунский, Г.А. Новичкова

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

Контактная информация:

Кривенцова Наталия Алексеевна,
врач-рентгенолог, лаборант-исследователь
отдела лучевой диагностики
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: nataliya.krivencova@fccho-moscow.ru

Цель исследования – оценить изменение показателей фракции жира (ФЖ) у пациентов с установленным диагнозом острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) по сравнению с детьми без гематологических заболеваний. При проведении исследования было получено информированное согласие на выполнение магнитно-резонансной томографии (МРТ) от каждого пациента или его законного представителя. Исследование одобрено независимым этическим комитетом, утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и соответствует Этическому кодексу Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация) для исследований с участием людей. В исследование вошли 33 здоровых добровольца в возрасте $13,4 \pm 2,8$ года (группа контроля) и 34 пациента с диагнозом ОЛЛ в острую фазу заболевания, средний возраст которых составил $12,2 \pm 3,6$ года (основная группа). ФЖ рассчитывалась на основании последовательности mDixon-Quant в области костей таза и поясничных позвонков при помощи построения карт на магнитно-резонансном томографе Philips Achieva 3T. Для сравнения данных ФЖ пациентов с группой контроля и между собой применялся U-критерий Манна-Уитни. Были выбраны 4 региона интереса размером 100 мм^2 : в телах правой и левой подвздошных костей, а также в телах позвонков L4 и L5. Для каждой группы и региона интереса было рассчитано среднее значение ФЖ. В группе пациентов в острый период ОЛЛ показатели были самые низкие: в телах подвздошных костей $3,53 \pm 2,75\%$ и $3,72 \pm 3,09\%$ слева и справа соответственно и в телах позвонков L4 и L5 $2,62 \pm 1,86\%$ и $2,47 \pm 2,17\%$ соответственно. В контрольной группе показатели по тем же точкам составили $51,3 \pm 9,5\%$; $49,9 \pm 11,0\%$; $31,3 \pm 8,73\%$ и $32,4 \pm 10,3\%$ соответственно. ФЖ в костном мозге существенно изменяется у пациентов с ОЛЛ по отношению к контрольной группе. Количественный анализ МРТ-изображений может стать новым методом оценки состояния костного мозга у детей с лейкоемиями.

Ключевые слова: педиатрия, онкогематология, лучевая диагностика

Терещенко Г.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 80–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-80-86

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 31.01.2023
Accepted 28.04.2023

Quantitative bone marrow magnetic resonance imaging in children with lymphoblastic leukaemia

G.V. Tereshchenko, N.A. Kriventsova, D.A. Kupriyanov, M.I. Abu Jabal, A.D. Kopaneva, N.V. Myakova, D.V. Litvinov, A.I. Karachunskiy, G.A. Novichkova

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

Correspondence:

Natalia A. Kriventsova,
a radiologist and a research technician
at the Department of Diagnostic Radiology
at the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: nataliya.krivencova@fccho-moscow.ru

The aim of the study was to evaluate fat fraction (FF) changes in patients diagnosed with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in comparison with children without haematological disorders. All the patients or their legal representatives gave their informed consent to magnetic resonance imaging (MRI). 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 and was conducted in line with the Ethical Principles of the World Health Organization (the Declaration of Helsinki) for Medical Research Involving Human Subjects. The study included 33 healthy volunteers aged 13.4 ± 2.8 years (the control group) and 34 patients with acute phase ALL whose mean age was 12.2 ± 3.6 years (the group of interest). Imaging of the pelvic bones and lumbar vertebrae was performed on a Philips Achieva 3T scanner using the mDixon-quant sequence, with a subsequent construction of FF maps. The Mann-Whitney U-test was used to compare the FF data of the cases with each other and with the controls. Four regions of interest were selected, 100 mm^2 each: in the bodies of the right and the left iliac bones as well as in the bodies of the L4 and L5 vertebrae. For each group of subjects and each region of interest, mean FF was calculated. In the group of the patients with acute phase ALL, FF was the lowest: $3.53 \pm 2.75\%$ and $3.72 \pm 3.09\%$ in the bodies of the left and right iliac bones respectively, and $2.62 \pm 1.86\%$ and $2.47 \pm 2.17\%$ in the L4 and L5 vertebrae respectively. In the control group, FF in the respective regions of interest was $51.3 \pm 9.5\%$; $49.9 \pm 11.0\%$; $31.3 \pm 8.73\%$ and $32.4 \pm 10.3\%$. It is obvious that bone marrow FF in the patients with ALL differs significantly from the control group. Quantitative MRI can become a new method for the assessment of changes in the bone marrow of children with leukaemias.

Key words: pediatrics, oncohematology, radiology

Tereshchenko G.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 80–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-80-86

Острый лейкоз – это самое частое злокачественное заболевание у детей, основной субстрат которого представляют опухолевые клетки, инфильтрирующие костный мозг (КМ). Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) составляет порядка 70% всех гемобластозов у детей [1]. Заболеваемость составляет 4:100 000 детского населения, пик приходится на первое пятилетие жизни, в более старших возрастных группах число заболевающих снижается [2].

При подозрении на ОЛЛ пациенту выполняют пункцию (аспирацию) КМ (КМП). Оценка полученного материала позволяет установить процентное соотношение различных клеток гемопоэза в образце КМ. Диагноз подтверждается в случае наличия более 25% бластов в КМ, однако этот показатель может достигать 80–90%. Помимо этого, проводится подтверждение лимфоидной дифференцировки патологического клона клеток методом мультипараметрической проточной цитометрии [2].

По гистологической классификации ОЛЛ относится к гиперклеточным состояниям. Клеточность в данном контексте понимают как отношение клеток миелоидного (кроветворного) ряда к клеткам микроокружения КМ, в том числе к адипоцитам. При ОЛЛ количество опухолевых бластных клеток резко увеличивается, угнетаются нормальные ростки кроветворения, количество жировой ткани относительно сокращается. Клеточность можно оценить по гистологическому исследованию КМ – материалу трепанобиопсии [3]. Как правило, у пациентов с ОЛЛ этот метод не применяется.

Одним из альтернативных способов оценки клеточности является магнитно-резонансная томография (МРТ), так как нормальные и патологические трансформации КМ влияют на интенсивность сигнала от костных структур на МРТ [4, 5]. В нашей практике мы часто сталкиваемся с подобными изменениями у детей с гемобластозами и цитопениями (рисунки 1).

Авторами показана высокая чувствительность всех последовательностей МРТ к неопластическим и воспалительным изменениям в КМ у детей [6]. Интенсивность сигнала (ИС) на T1-взвешенных изображениях (T1-ВИ) и T2-взвешенных изображениях (T2-ВИ) изменяется при поражении КМ у пациентов с гематологическими нарушениями [5]. Фракция жира (ФЖ), рассчитываемая как отношение сигнала жира к сигналу жира и воды с поправками на T2*, позволяет косвенно оценить соотношение клеток миелопоэза и жировых клеток в структуре КМ [7].

С учетом международных рекомендаций проведения КМП у детей, в которых указано, что пункции выполняются только из гребней подвздошных костей, для оценки состояния КМ поле обзора распола-

гают с полным захватом подвздошных костей [8]. Многие исследователи включают в анализ помимо подвздошных костей еще и позвонки, поэтому поясничный отдел позвоночника также входит в поле обзора [9].

Целью данного исследования являлась оценка изменений ФЖ, рассчитанной при помощи МРТ, в КМ у пациентов с ОЛЛ. Для подтверждения гипотезы, что показатели ФЖ в нормальном и патологически инфильтрированном КМ различны, проводилось сравнение с группой здоровых добровольцев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

В исследовании приняли участие 34 пациента (19 мальчиков и 15 девочек) с клинически и морфологически подтвержденным диагнозом ОЛЛ, получавших лечение в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с октября 2017 г. по август 2022 г., медиана возраста составила 12,1 (9,9–15,0) года (основная группа).

Все пациенты на момент проведения МРТ-сканирования находились в острой фазе заболевания, до начала специфического лечения. В исследование включались пациенты, впервые заболевшие ОЛЛ, а также с первым рецидивом заболевания. В первой острой фазе заболевания находились 24 пациента, во второй острой фазе – 10. В *таблице 1* представлено число пациентов с нормальным уровнем лейкоцитов в периферической крови, с умеренной лейкопенией и гиперлейкоцитозом на момент первичного обследования.

Группа контроля состояла из 33 здоровых добровольцев (22 мальчика и 9 девочек) без гематологических заболеваний в анамнезе, медиана возраста составила 14,0 (12,3–15,0) года.

Все пациенты и/или их законные представители подписали письменное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено независимым этическим комитетом, утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и соответствует Этическому кодексу Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация) для исследований с участием людей [10].

Протокол магнитно-резонансной томографии

МРТ-сканирование выполнялось в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева на томографе Philips Achieva dStream 3T (Philips Healthcare, Best, Нидерланды). Для регистрации сигнала в комбинации друг с другом применялись приемная 8-канальная брюшная катушка (dStream FlexCoverage) и Posterior FlexCoverage (встроенная в стол томо-

Рисунок 1

МРТ костей таза в коронарной плоскости

А, Б – здоровый доброволец без гематологических заболеваний, T1-ВИ и T2-ВИ; В, Г – пациентка в острую фазу ОЛЛ до лечения, T1-ВИ и T2 STIR-ВИ

Figure 1

Coronal magnetic resonance image (MRI) of the pelvic bones

A, B – a healthy volunteer without any hematological diseases, T1WI and T2WI; В, Г – a patient in the acute phase of ALL before treatment, T1WI and T2 STIR WI

**Таблица 1**

Число пациентов с первым и вторым острым периодом ОЛЛ в зависимости от показателя количества лейкоцитов в периферической крови

Table 1

The number of patients with the first and second acute episodes of acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in accordance with the number of leukocytes in the peripheral blood

Параметр Parameter	Гиперлейкоцитоз ($> 9,85 \times 10^9/\text{л}$) Hyperleukocytosis ($> 9.85 \times 10^9/\text{L}$)	Нормоцитоз ($6,05-9,85 \times 10^9/\text{л}$) Normocytosis ($6.05-9.85 \times 10^9/\text{L}$)	Лейкопения ($< 6,05 \times 10^9/\text{л}$) Leukopenia ($< 6.05 \times 10^9/\text{L}$)
Первый острый период ($n = 24$) Before first-line treatment ($n = 24$)	9	3	12
Второй острый период ($n = 10$) Before second-line treatment ($n = 10$)	6	2	2

графа). Исследовательский МРТ-протокол включал в себя измерение значений ФЖ с помощью методики mDixon-quant, выполненной в коронарной плоскости с полным захватом костей таза и поясничного отдела позвоночника.

Последовательность mDixon-quant имела следующие параметры регистрации: градиентная последовательность мультиэхо (6 времен эхо – минимальное TE_1) – 1,2 мс, инкремент (ΔTE) – 0,8 мс; время повторения TR – 11 мс; угол опрокидывания (FA) –

3° , для минимизации эффекта влияния T1-взвешенности; количество срезов – 35, толщина среза – 4 мм с зазором, составляющим –2 мм; поле обзора – $360 \times 360 \text{ мм}^2$, размер вокселя – $3,5 \times 3,5 \times 4,0 \text{ мм}$ / $2,5 \times 2,5 \times 2,0 \text{ мм}$ (при регистрации/реконструированный); частотное кодирование в направлении А/Р в целях минимизации артефактов от дыхания пациента; коэффициент ускорения SENSE – 2. Время сканирования 1 мин 2 с. Получение карт распределения PDFF осуществлялось автоматически на МРТ-консоли с использованием 7-пиковой жировой модели, а также с учетом необходимых поправок на T2*-взвешенность.

На полученных картах, представленных на рисунке 1, рассчитывались средние значения PDFF из ROI размерами 100 мм^2 в телах позвонков L4 и L5, а также в правой и левой подвздошных костях (рисунк 2).

Статистический анализ

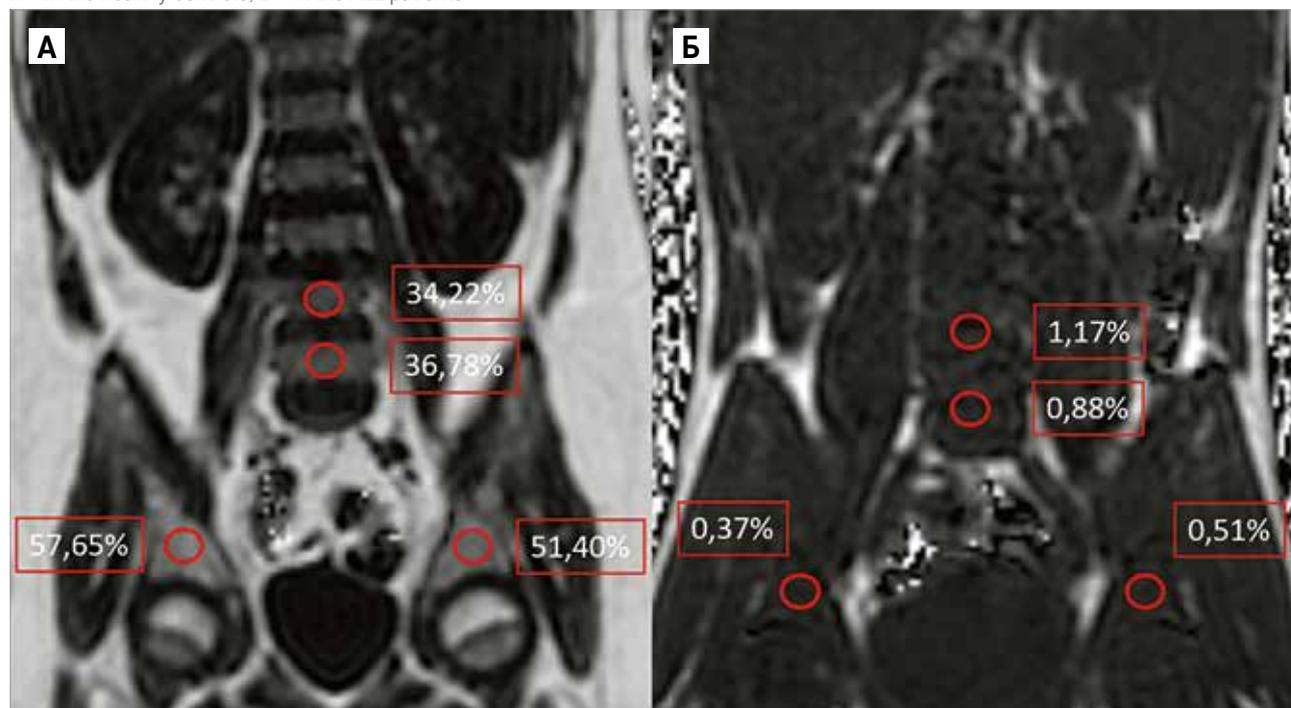
Анализ результатов проводился при помощи методов параметрической и непараметрической статистики. Статистическая обработка данных осуществлялась при помощи программных пакетов Jamovi 2.2.5 (the jamovi project (2021), version 1.6 (Computer Software, <https://www.jamovi.org>) и Excel 2016 (Microsoft, США).

Рисунок 2

Пример расположения регионов интереса (ROI) в области подвздошных костей и позвонков на картах ФЖ
А – в группе здоровых добровольцев; Б – в группе пациентов с ОЛЛ

Figure 2

Regions of interest (ROIs) in the iliac bones and vertebrae on fat fraction (FF) maps
A – in the healthy controls; Б – in the ALL patients



Проверка на нормальность производилась на основе анализа диаграмм распределения данных и при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения данных, распределенных по нормальному закону, применялся t-критерий Стьюдента. Для оценки выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, был применен U-критерий Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,01$, все p -значения были двусторонними.

Расчет чувствительности и специфичности метода производился при помощи ROC-анализа с подсчетом положительной и отрицательной предиктивной возможностей метода, а также расчета площади под кривой (AUC). Корреляционный анализ выполнялся с применением критерия Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среднее значение ФЖ КМ по всем точкам в группе здоровых добровольцев составило $41,2 \pm 9,88\%$. В острую фазу ОЛЛ отмечалось резкое снижение ФЖ до $3,09 \pm 2,47\%$. Показатели средних значений измеряемого коэффициента диффузии для всех групп пациентов в различных точках измерения представлены в *таблице 2*.

Поскольку при данной работе распределение значений ФЖ и возраста пациентов в исследуемых выборках не всегда подчинялось законам нормаль-

ного распределения, то для сравнения значений внутри одной группы по разным точкам и групп между собой был выбран непараметрический статистический критерий.

При сравнении возраста пациентов с ОЛЛ и здоровых добровольцев при помощи U-критерия Манна–Уитни не было выявлено достоверной разницы ($p < 0,05$). Также не было выявлено статистически значимой разницы при попарном сравнении показателей ФЖ внутри группы здоровых добровольцев по точкам IliumL и IliumR, L4 и L5 ($p < 0,05$).

При попарном сравнении значений ФЖ КМ различных групп пациентов в каждой точке измерения (в каждой костной структуре) при помощи

Таблица 2

Показатели ФЖ для группы пациентов и группы контроля в различных ROI – в костях таза и поясничных позвонках, средние значения \pm стандартные отклонения

Table 2

FF mean values \pm standard deviations in the cases and the controls in different ROIs located in the pelvic bones and the lumbar vertebrae

Группа Group	ФЖ Ilium L, % FF Ilium L, %	ФЖ Ilium R, % FF Ilium R, %	ФЖ L4, % FF L4, %	ФЖ L5, % FF L5, %
Здоровые добровольцы (n = 33) Healthy controls (n = 33)	51,3 \pm 9,5	49,9 \pm 11,0	31,3 \pm 8,73	32,4 \pm 10,3
Острая фаза заболевания (n = 34) Acute phase of ALL (n = 34)	3,53 \pm 2,75	3,72 \pm 3,09	2,62 \pm 1,86	2,47 \pm 2,17

Рисунок 3

Диаграмма разброса значений переменной ФЖ для группы пациентов и группы контроля по 4 ROI – в костях таза и поясничных позвонках

Figure 3

FF in the cases and the controls in the four ROIs in the pelvic bones and the lumbar vertebrae

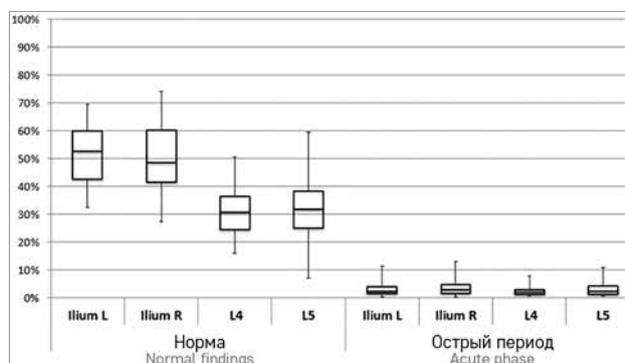


Таблица 3

Чувствительность и специфичность ФЖ в определении ОЛЛ

Table 3

The sensitivity and specificity of FF in determining ALL

ROI	Отсечка, % A cut-off point, %	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %	AUC
Ilium L	32,35	100	100	1,0
Ilium R	27,23	100	100	1,0
L4	16,07	100	100	1,0
L5	17,98	96,97	100	0,999

U-критерия Манна–Уитни была выявлена достоверная разница показателей ФЖ ($p < 0,01$) (рисунок 3).

На основании ROC-анализа были выявлены границы отсечки значений ФЖ КМ, позволяющие отделить пациента с ОЛЛ от здорового добровольца. В таблице 2 указаны показатели чувствительности, специфичности и AUC для каждой точки измерения. На рисунке 4 представлена ROC-кривая для представленного анализа.

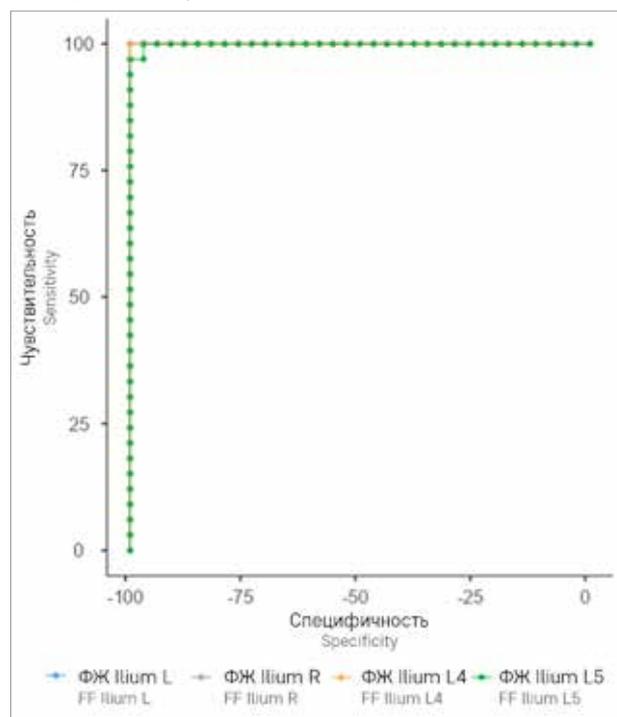
Пациенты были разделены на две группы в зависимости от того, первый раз был установлен диагноз или это был рецидив заболевания. На основании этой бинарной классификации была построена ROC-кривая для показателя ФЖ в КМ, которая не показала значимого результата (рисунок 5А). Помимо этого, пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа – пациенты с инициальной лейкопенией и нормоцитозом в периферической крови, 2-я группа – пациенты с гиперлейкоцитозом. На основании данной бинарной классификации была построена ROC-кривая для показателя ФЖ в КМ, которая не показала значимого результата (рисунок 5Б). Также был выполнен корреляционный анализ между количеством лейкоцитов и ФЖ КМ, коэффициент корреляции Пирсона составил $-0,127$, что указывает на отсутствие взаимосвязи этих 2 количественных показателей.

Рисунок 4

Кривая ошибок бинарной классификации ОЛЛ/не-ОЛЛ при помощи оценки ФЖ в КМ, рассчитанной на основе последовательности mDixon-quant

Figure 4

An ALL/non-ALL ROC-curve of FF in the bone marrow measured by mDixon-quant MRI



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем исследовании впервые в России на детской выборке показана чувствительность количественного метода МРТ оценки ФЖ в КМ у пациентов с ОЛЛ. Полученные показатели ФЖ КМ у пациентов с ОЛЛ существенно отличались от показателей здоровых добровольцев той же возрастной группы.

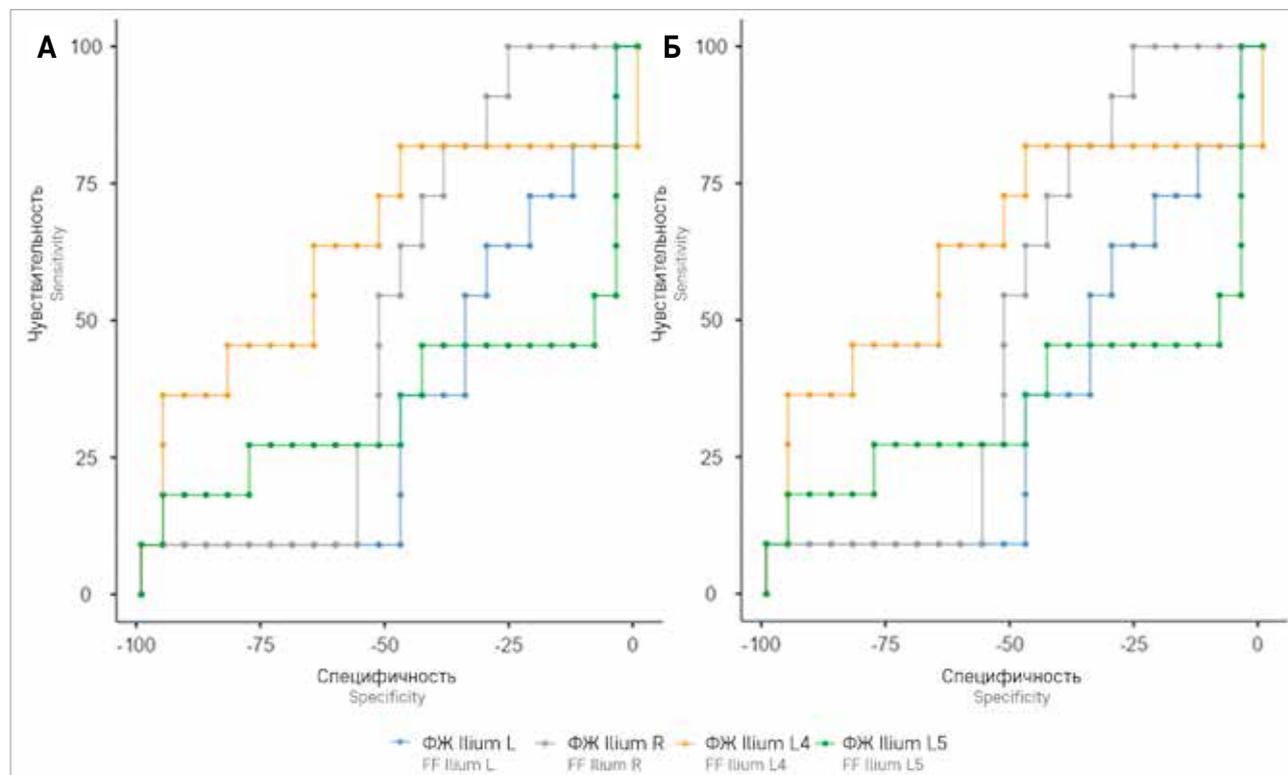
Современные протоколы терапии позволяют излечить до 95% маленьких пациентов, однако своевременная диагностика рецидива по-прежнему является актуальной [11]. С учетом полученных нами данных одним из методов превентивной неинвазивной диагностики и идентификации рецидива заболевания способна выступить МРТ с оценкой ФЖ КМ. МРТ не имеет лучевой нагрузки, не требует подготовки и редко требует применения анестезиологического пособия. Оценка состояния КМ при помощи МРТ может дать врачам дополнительную немаловажную информацию о КМ в целом, а не только о его миелoidной части. Помимо этого, МРТ позволяет оценить количество жира в любой костной структуре организма в зависимости от клинической необходимости.

Рисунок 5

Кривая ошибок бинарной классификации при помощи оценки ФЖ в КМ пациентов с ОЛЛ, рассчитанной на основе последовательности mDixon-quant
 А – для классификации первой и второй острых фаз заболевания; Б – для классификации наличия/отсутствия гиперлейкоцитоза в периферической крови

Figure 5

An ROC-curve of FF in the bone marrow of the ALL patients measured by the mDixon-quant sequence
 A – for the classification of the first and second acute phases of the disease; B – for the classification of the presence/absence of hyperleukocytosis in peripheral blood



Количество опубликованных исследований, посвященных оценке ФЖ в КМ у детей крайне ограничено. В 2017 г. была опубликована одна из первых статей, посвященных измерению ФЖ КМ в педиатрической популяции, однако эта работа была выполнена на когорте здоровых детей, измерения проводились только в области позвонков. По представленным данным, среднее значение ФЖ в позвонках L1–L5 в группе детей в возрасте от 9 до 18 лет составило $32,9 \pm 11,3\%$, что полностью согласуется с нашими данными [12].

Визуальная оценка КМ на изображениях МРТ очевидна, однако не объективна и не может дать нам никаких количественных характеристик, поэтому только ее может быть недостаточно для описания состояния КМ на момент исследования [4]. В данной работе была предпринята попытка подбора количественного параметра МРТ для объективизации видимых нами изменений.

В одной из последних работ 2021 г. были описаны пациенты со злокачественными изменениями КМ в возрасте от 3 до 10 лет (4 ребенка с ОЛЛ и 1 – с метастатической формой рабдомиосаркомы), при которых ФЖ составила $3,8 \pm 1,2\%$. Контрольная группа составила 7 детей в возрасте от 1 до 13 лет, среднее

значение ФЖ – $46,1 \pm 12,3\%$ [13]. Наши данные также подтверждают гипотезу, что ФЖ существенно снижается при ОЛЛ. Однако наше исследование включает большее число здоровых добровольцев и более однородную выборку пациентов с одинаковым диагнозом.

В ходе анализа были найдены статистически достоверные отличия между количеством жира в КМ подвздошных костей и позвонков. Более низкое количество жира в позвонках может говорить о более высокой клеточности КМ в данных костных структурах. Снижение ФЖ в подвздошных костях и позвонках при ОЛЛ происходит равномерно. При данной нозологии статистически значимых различий ФЖ в позвонках и подвздошных костях не выявлено.

В острый период заболевания, независимо от того, впервые выявлено заболевание или это рецидив ОЛЛ, зафиксировано одинаково резкое падение показателя ФЖ.

Помимо этого, интересной находкой является то, что клеточность КМ никак не коррелирует с числом лейкоцитов в периферической крови пациента. Показатели периферической крови могут иметь существенный разброс при относительно небольшом разбросе значений ФЖ КМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании было показано, что показатели ФЖ КМ у пациентов в острую фазу лейкемии значительно отличаются при сравнении с контрольной группой здоровых добровольцев. Таким образом, у детей с подозрением на лейкемию или уже установленным диагнозом количественная МРТ-оценка показателей ФЖ представляет собой новый быстрый, безболезненный и неинвазивный метод диагностики и подтверждения высокой клеточности КМ, а также может стать потенциальным методом мониторинга состояния КМ при других гематологических заболеваниях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья финансировалась в рамках гранта Российского научного фонда №22-25-00553 «Новые МРТ-технологии в исследовании тканевых характеристик костного мозга при апластической анемии: возможности контроля эффективности терапии и сравнение с результатами гистопатоморфологии».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Tereshchenko G.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7317-7104>

Kriventsova N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4164-004X>

Kupriyanov D.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5662-896X>

Abu Jabal M.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5216-7427>

Kopaneva A.D. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-8093-3221>

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

Litvinov D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7461-0050>

Karachunskiy A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9300-5198>

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

Литература

1. Мень Т.Х., Поляков В.Г., Алиев М.Д. Эпидемиология злокачественных новообразований у детей в России. Онкопедиатрия 2014; (1): 7–12.
2. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Румянцева Ю.В., Карачунский А.И. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков. М.; 2015. С. 42.
3. Криволапов Ю.А. Биопсии костного мозга: научно-практическое издание. М.: Практическая медицина; 2014.
4. Foster K., Chapman S., Johnson K. MRI of the marrow in the paediatric skeleton. Clin Radiol 2004; 59 (8): 651–73. DOI: 10.1016/j.crad.2004.02.001
5. Karampinos D.C., Ruschke S., Dieckmeyer M., Diefenbach M., Franz D., Gersing A.S., et al. Quantitative MRI and spectroscopy of bone marrow. J Magn Reson Imaging 2018; 47 (2): 332–53. DOI: 10.1002/jmri.25769
6. Chan B.Y., Gill K.G., Rebsamen S.L., Nguyen J.C. MR Imaging of Pediatric Bone Marrow. Radiographics. 2016; 36 (6): 1911–30. DOI: 10.1148/rg.2016160056
7. Bainbridge A., Bray T.J.P., Sengupta R., Hall-Craggs M.A. Practical Approaches to Bone Marrow Fat Fraction Quantification Across Magnetic Resonance Imaging Platforms. J Magn Reson Imaging 2020; 52 (1): 298–306. DOI: 10.1002/jmri.27039
8. Abla O., Friedman J., Doyle J. Performing bone marrow aspiration and biopsy in children: Recommended guidelines. Paediatr Child Health 2008; 13 (6): 499–501. DOI: 10.1093/pch/13.6.499
9. Baum T., Rohrmeier A., Syväri J., Diefenbach M.N., Franz D., Dieckmeyer M., et al. Anatomical variation of age-related changes in vertebral bone marrow composition using chemical shift encoding-based water-fat magnetic resonance imaging. Front Endocrinol (Lausanne) 2018; 9: 141. DOI: 10.3389/fendo.2018.00141
10. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA 2013; 310 (20): 2191–4. DOI: 10.1001/jama.2013.281053
11. Whitehead T.P., Metayer C., Wiemels J.L., Singer A.W., Miller M.D. Childhood leukemia and primary prevention. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2016; 46 (10): 317–52. DOI: 10.1016/j.cppeds.2016.08.004
12. Ruschke S., Pokorney A., Baum T., Eggers H., Miller J.H., Hu H.H., et al. Measurement of vertebral bone marrow proton density fat fraction in children using quantitative water-fat MRI. MAGMA 2017; 30 (5): 449–60. DOI: 10.1007/s10334-017-0617-0
13. Samet J.D., Deng J., Schafernak K., Arva N.C., Lin X., Peevey J., et al. Quantitative magnetic resonance imaging for determining bone marrow fat fraction at 1.5 T and 3.0 T: a technique to noninvasively assess cellularity and potential malignancy of the bone marrow. Pediatr Radiol 2021; 51 (1): 94–102. DOI: 10.1007/s00247-020-04809-8

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 31.01.2023
Принята к печати 28.04.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-88-93

Возможность использования гематологического показателя фракции незрелых тромбоцитов при назначении трансфузий тромбоцитарной массы

М.И. Маркелов¹, С.А. Плясунова²

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

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

Контактная информация:

Плясунова Светлана Александровна,
канд. мед. наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: plyasunova@yandex.ru

Цель: оценить прогностическую ценность гематологического показателя фракции незрелых тромбоцитов (IPF) при назначении трансфузий тромбоцитарной массы. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Нами выполнен мониторинг гематологического показателя IPF у 6 пациентов до и после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Материалом для исследования служила цельная кровь с антикоагулянтом K₃ЭДТА. Определение уровня IPF проводили методом проточной цитофлуориметрии на автоматическом гематологическом анализаторе SYSMEX XE-2100 (Sysmex, Kobe, Япония). Наличие антитромбоцитарных антител определяли твердофазной тест-системой детекции антител к тромбоцитам IgG Capture-P Ready-Screen на анализаторе NEO Blood Analyzer by Immucor, Inc. Установлено, что использование гематологического показателя IPF дает возможность раннего диагностирования приживления тромбоцитарного ростка, а также позволяет более рационально принимать решения о назначении трансфузий тромбоцитарной массы. Было показано, что отсутствие увеличения числа тромбоцитов в ответ на рост IPF > 6% является критерием к назначению скрининга антитромбоцитарных антител в сыворотке. IPF дает возможность судить об отсутствии приживления тромбоцитарного ростка после процедуры ТГСК, не прибегая к костномозговой пункции. Параметр IPF обладает большой клинической значимостью, при включении в число рутинных гематологических показателей его можно использовать как дополнительный критерий к назначению трансфузий тромбоцитарной массы и скринингу антитромбоцитарных антител с последующим индивидуальным подбором тромбоцитов.
Ключевые слова: фракция незрелых тромбоцитов, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, трансфузия тромбоцитарной массы

Маркелов М.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 88–93. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-88-93

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 31.01.2023
Accepted 28.04.2023

Using immature platelet fraction as a factor in deciding on the need for platelet transfusions

M.I. Markelov¹, S.A. Plyasunova²

¹National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Correspondence:
Svetlana A. Plyasunova,
Cand. Med. Sci., Head of Clinical
and Diagnostic Laboratory
of the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: plyasunova@yandex.ru

Our study aimed to assess the prognostic significance of immature platelet fraction (IPF) and its role in deciding whether to transfuse platelets. 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. We monitored this hematologic parameter in 6 patients before and after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). For the study, we used whole blood collected in K₃EDTA tubes. IPF levels were measured by flow cytometry on the automated hematology analyzer SYSMEX XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan). The presence of platelet antibodies was detected using Capture-P Ready-Screen solid phase system for the detection of antibodies to platelets and the NEO Blood Bank Analyzer by Immucor, Inc. It was shown that the use of IPF enabled an early establishment of platelet engraftment and helped to make more a reasoned decision regarding the transfusion of platelets. It was established that if a rise in IPF > 6% was not accompanied by an increase in platelet count, serum platelet antibody testing was needed. IPF can help diagnose platelet engraftment failure following HSCT and thus eliminate the need for bone marrow aspiration. IPF is of great clinical importance; if adopted as a routine hematologic parameter, it can serve as an additional factor in deciding on the need for platelet transfusions and platelet antibody testing and subsequent personalized selection of platelets.
Key words: immature platelet fraction, hematopoietic stem cell transplantation, platelet transfusion

Markelov M.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 88–93.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-88-93

Лечение острых гематологических злокачественных новообразований предполагает использование интенсивной цитотоксической химиотерапии с различной интенсивностью кондиционирования, которая угнетает процесс кроветворения. После этого пациенты могут перенести аутологичную или аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). ТГСК в 100% случаев сопровождается тромбоцитопенией [1], которая может привести к геморрагическим осложнениям и смерти пациента.

Переливание тромбоцитов – важная часть профилактики и коррекции кровотечений в посттрансплантационном периоде, сопровождающемся регулярным мониторингом гематологических показателей. У пациентов с разными заболеваниями потребность в компонентах крови после ТГСК различна [2]. На сегодняшний день профилактические переливания тромбоцитов осуществляются, когда их количество падает до отметки $5\text{--}20 \times 10^9/\text{л}$ [3]. Для инвазивных процедур количество тромбоцитов может быть на более высоком уровне [4].

Когда у пациента, получающего химиотерапевтическое лечение, количество тромбоцитов впервые падает ниже $20 \times 10^9/\text{л}$, можно предположить, опираясь на опыт других авторов, что значение будет продолжать падать в течение некоторого периода, индивидуального для каждого пациента [5]. Решение о том, когда переливать тромбоциты, зависит от автоматического подсчета тромбоцитов, который входит в общий анализ крови. Национальным объединением по внешнему контролю качества Великобритании (UK National External Quality Assessment Scheme for Haematology) было сообщено, что коэффициент вариации в образце крови с количеством тромбоцитов менее $10 \times 10^9/\text{л}$ может составлять от 20 до 60%, что может указывать на неточный подсчет тромбоцитов у данных пациентов [6].

Способность точно спрогнозировать, когда произойдет восстановление пула тромбоцитов, должна обеспечить более информативный подход к их профилактическому переливанию.

Одним из возможных подходов в предсказании восстановления количества тромбоцитов, а также дополнительным критерием при назначении трансфузий тромбомассы является измерение фракции незрелых/ретикулированных/сетчатых тромбоцитов (IPF) [5]. Ретикулированные тромбоциты содержат РНК, представляют собой незрелые, недавно отшнурованные тромбоциты, которые являются более крупными и более физиологически активными по сравнению со зрелыми тромбоцитами. Отношение незрелых тромбоцитов к общему количеству тромбоцитов отражает скорость тромбопоэза, которая увеличивается с повышением

продукции тромбоцитов и уменьшается, когда она снижается.

IPF – воспроизводимый параметр, хорошо коррелирующий с количеством ретикулярных тромбоцитов, полученных методом проточной цитометрии с использованием антител CD61 [7]. Следует отметить, что тромбоцитопения с увеличенным показателем IPF может служить признаком повышенной деструкции тромбоцитов в периферической крови, потери тромбоцитов или наследственной макротромбоцитопении. Тромбоцитопения с нормальным или пониженным значением IPF может служить признаком сниженного образования тромбоцитов в костном мозге. IPF подсчитывается как в абсолютных значениях и выражается в литрах (л), так и в относительных и выражается в процентах (%) от общего числа тромбоцитов. Нормальный диапазон значений для IPF составляет 1,1–6,1% [8, 9].

Цель нашего исследования – оценить новый быстрый метод анализа IPF с использованием гематологического анализатора SYSMEX XE-2100 (Sysmex, Kobe, Япония) и установить потенциальную прогностическую ценность IPF при определении восстановления количества тромбоцитов после интенсивной цитотоксической химиотерапии и ТГСК. Это должно позволить проводить более контролируемую профилактическую политику переливания тромбоцитов при определенных пороговых значениях, особенно когда будут очевидны неизбежное восстановление мегакариоцитов и рост числа тромбоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В исследовании приняли участие 6 пациентов с запланированной процедурой ТГСК. Осуществлялся мониторинг гематологических показателей: тромбоцитов, абсолютного и относительного значения IPF до и после процедуры ТГСК. Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от тяжести посттрансплантационных осложнений и качества приживления трансплантата (таблица).

Образцы периферической крови пациентов собирали в пробирки с K_2EDTA (SARSTEDT AG & Co. KG Sarstedtstraße 1D-51588 Nümbrecht) и анализировали в клинично-диагностической лаборатории на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XE-2100. Определяли количество тромбоцитов в канале CBC, процентное содержание и абсолютное число IPF в канале RET, режим PLT-0. Все образцы были проанализированы в течение 2–4 ч после забора крови.

Таблица
Характеристика пациентов

Table
Patient characteristics

Группа Group	Пациенты Patients	Характеристика Characteristics
1	Девочка К., 16 лет, диагноз: ОМЛ-M2 Мальчик З., 8 лет, диагноз: ОМЛ-M1 The girl K., 16 years old, diagnosed with AML-M2 The boy Z., 8 years old, diagnosed with AML-M1	Приживление трансплантата, минимум осложнений Successful engraftment, minor complications
2	Девочка Е., 13 лет, диагноз: ОЛЛ-B2 Мальчик Ч., 3 года, диагноз: ОЛЛ-B2 The girl E., 13 years old, diagnosed with ALL-B2 The boy Ch., 3 years old, diagnosed with ALL-B2	Гипофункция тромбоцитарного ростка, рефрактерность к трансфузиям тромбоцитной массы Hypofunction of platelet lineage; refractoriness to platelet transfusion
3	Девочка М., 1,5 года, диагноз: МДС Мальчик Б., 4 года, диагноз: АА The girl M., 1.5 years old, diagnosed with MDS The boy B., 4 years old, diagnosed with AA	Отторжение трансплантата, септические осложнения Graft rejection; septic complications

Примечание. ОМЛ-M2 – острый миелоидный лейкоз, M2-вариант; ОМЛ-M1 – острый миелоидный лейкоз, M1-вариант; ОЛЛ-B2 – острый лимфобластный лейкоз, B2-вариант; МДС – миелодиспластический синдром; АА – апластическая анемия.

Note. AML-M2 – M2 subtype of acute myeloid leukemia; AML-M1 – M1 subtype of acute myeloid leukemia; ALL-B2 – common (B-ll) subtype of acute lymphoblastic leukemia; MDS – myelodysplastic syndrome; AA – aplastic anemia.

Для определения антитромбоцитарных антител использовали анализатор NEO Blood Analyzer by Immucor, Inc. и твердофазную тест-систему детекции антител к тромбоцитам IgG Capture-P Ready-Screen. Данная тест-система позволяет выявить наличие антител в плазме пациента к тромбоцитарным антигенам системы HLA-A, B и системы HPA: HPA-1a, 1b; HPA-4a, 4b; HPA-3a, 3b; HPA-5b, 5a, HPA-6a, 6b, HPA-15b, 15a, HPA-9b, 9a.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного мониторинга гематологических показателей тромбоцитов и IPF 6 пациентов были условно разделены на 3 группы.

Результаты мониторинга пациентов 1-й группы

Пациентка К., наблюдается закономерное снижение тромбоцитов на этапе кондиционирования. На данном этапе от -5-х до 0-х суток происходит угнетение тромбоцитарного роста, циркулирующие в крови тромбоциты постепенно погибают, в то время как в костном мозге не происходит высвобождения новых тромбоцитов (рисунок 1).

Далее в раннем посттрансплантационном периоде пациентке осуществляли трансфузию тромбоконцентрата 5 раз. Заключение о приживлении тромбоцитарного ростка, сделанное на основании уровня тромбоцитов, было принято на +12-е сутки, в то время как относительный уровень IPF начал расти уже на +8-е сутки (рисунок 1), а абсолютный уровень

IPF – на +9-е сутки (рисунок 2). Данный рост говорит о возобновлении функционирования тромбоцитарного ростка и начале продуцирования собственных тромбоцитов. Восстановление тромбоцитов зафиксировано после достижения максимального относительного значения IPF (recovery after peak). Начиная с +12-х суток происходит активный рост числа тромбоцитов и одновременное закономерное снижение относительного значения IPF.

Пациент З., от начала этапа кондиционирования и до +5-х суток происходит снижение количества тромбоцитов на фоне прекращения функционирования тромбоцитарного ростка (рисунки 3, 4). На +13-е сутки на основании уровня тромбоцитов было зафиксировано приживление тромбоцитарного ростка. Начало роста абсолютного значения IPF зафиксировано на +9-е сутки, начало восстановления тромбоцитов – после достижения положительной динамики роста IPF (recovery after rising trend).

Таким образом, мониторинг пациентов 1-й группы показал, что использование абсолютных и относи-

Рисунок 1
Мониторинг относительного уровня IPF и тромбоцитов пациентки К.
Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 1
The monitoring of the IPF percentage and platelet counts in the patient K.
The arrow indicates the day of transplantation; triangle markers indicate the days of platelet transfusion

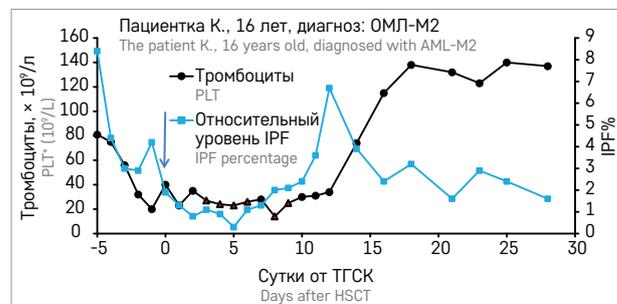
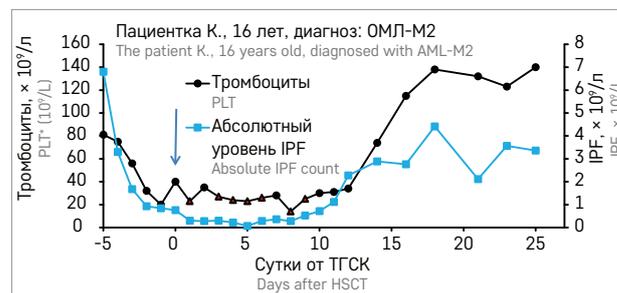


Рисунок 2
Мониторинг абсолютного уровня IPF и тромбоцитов пациентки К.
Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 2
The monitoring of the absolute IPF counts and platelet counts in the patient K.
The arrow indicates the day of transplantation; triangle markers indicate the days of platelet transfusion



тельных показателей IPF дает возможность более раннего диагностирования приживления тромбоцитарного ростка (раньше на 4 дня в сравнении со случаем, когда единственным критерием является уровень тромбоцитов). А также использование данных показателей в случае с пациенткой К. позволило бы отказаться от 2 профилактических трансфузий тромбоцитов на +8-е и +9-е сутки, так как в это время уже наблюдался активный рост относительного значения IPF.

Результаты мониторинга пациентов 2-й группы

Пациентка Е., на этапе кондиционирования наблюдается закономерное снижение уровня тромбоцитов и IPF. В день миелоинфузии число тромбоцитов падает до $17 \times 10^9/\text{л}$, в связи с чем девочке в течении 2 дней назначали переливание тромбоконцентрата. После этого у пациентки наблюдается кратковременное увеличение уровня тромбоцитов и IPF, к +3-м суткам уровень тромбоцитов достиг $86 \times 10^9/\text{л}$ (рисунки 5, 6).

Данный подъем является следствием проведенных трансфузий, а не работы костного мозга

Рисунок 3

Мониторинг относительного уровня IPF и тромбоцитов пациента З.

Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 3

The monitoring of the IPF percentage and platelet count in the patient Z.

The arrow indicates the day of transplantation; triangle markers indicate the days of platelet transfusion

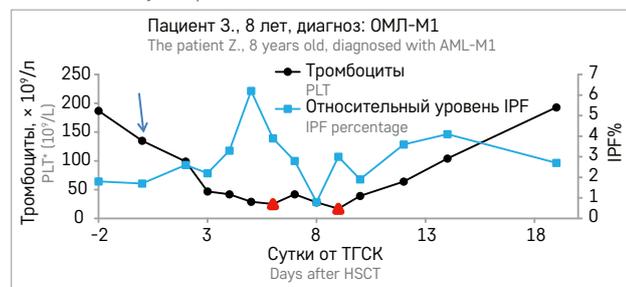


Рисунок 4

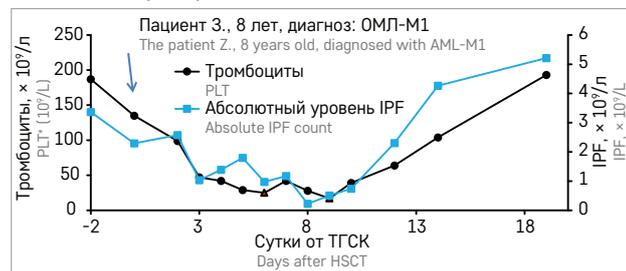
Мониторинг абсолютного уровня IPF и тромбоцитов пациента З.

Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 4

The monitoring of the absolute IPF count and platelet count in the patient K.

The arrow indicates the day of transplantation; triangle markers indicate the days of platelet transfusion



пациентки, о чем свидетельствует дальнейшее снижение тромбоцитов и IPF к +6-м суткам. С +8-х по +10-е сутки девочке было назначено 4 переливания тромбоконцентрата, за которыми не последовало увеличения уровня тромбоцитов. К +17-м суткам наблюдается подъем относительного и абсолютного уровня IPF (рисунки 5, 6), что говорит о начале функционирования костного мозга. Однако в ответ на повышение IPF не происходит рост тромбоцитов. На основании уровня тромбоцитов сделано заключение о гипофункции тромбоцитарного ростка на +26-е сутки.

Пациент Ч., выполнено множественное переливание тромбоцитарной массы в раннем посттрансплантационном периоде, которое не давало ответа в виде повышения уровня тромбоцитов. С +14-х суток наблюдается резкий подъем абсолютного уровня IPF (рисунок 7), что говорит о начале продукции собственных тромбоцитов в костном мозге, однако на протяжении от +14-х до +36-х суток наблюдения не происходит адекватного роста тромбоцитов. Также

Рисунок 5

Мониторинг относительного уровня IPF и тромбоцитов пациентки Е.

Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 5

The monitoring of IPF percentage and platelet count in the patient E.

The arrow indicates the day of transplantation, triangle markers indicate the days of platelet transfusion

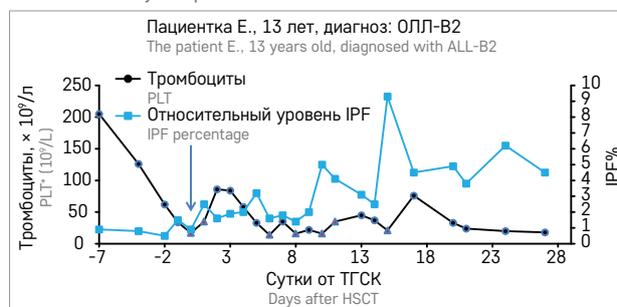


Рисунок 6

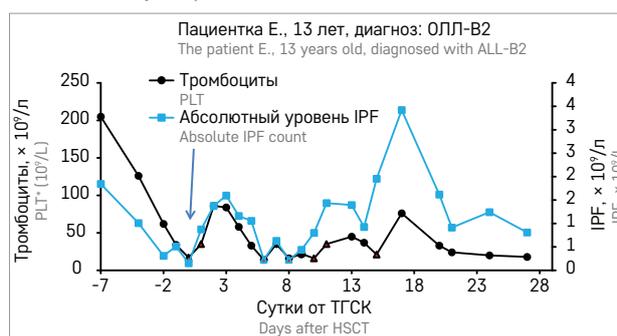
Мониторинг абсолютного уровня IPF и тромбоцитов пациентки Е.

Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 6

The monitoring of the absolute IPF count and platelet count in the patient E.

The arrow indicates the day of transplantation, triangle markers indicate the days of platelet transfusion



нет ответа в виде повышения уровня тромбоцитов на переливания тромбомассы. На +21-е сутки сделано заключение о гипофункции тромбоцитарного роста, на +40-е сутки – заключение о рецидиве основного заболевания.

Повышение уровня IPF и отсутствие в последствии положительной динамики роста тромбоцитов говорит о том, что костный мозг активно продуцирует тромбоциты, однако они не доживают до своего зрелого состояния. Данное явление в совокупности с рефрактерностью к выполненным трансфузиям тромбоконцентрата пациентам Ч. и Е. позволило сделать предположение о повышенной периферической деструкции тромбоцитов, вызванной иммунной реакцией. Для проверки данного предположения было решено провести скрининг на наличие антитромбоцитарных антител в крови пациентов из 2-й группы при помощи тест системы Capture-P Ready-Screen и автоматического анализатора Immucor NEO.

В результате скрининга у пациента Ч. были выявлены антитела IgG к тромбоцитарным антигенам системы HPA: 5b, 5a; 6b; 9a, у пациентки Е. – 1a, b; 4a, b; 3b; 5a, b; 6a, b; 9a, b.

Таким образом, мы подтвердили, что явления рефрактерности к трансфузиям тромбомассы, а также отсутствие повышения уровня тромбоцитов при повышении абсолютного и относительного значения IPF вызваны иммунологическим разрушением тромбоцитов. Использование данных показателей в рутинной практике позволило бы вовремя сделать предположение о том, что костный мозг начал продукцию тромбоцитов, но они подвержены деструкции со стороны иммунной системы, выявить антитромбоцитарные антитела IgG, назначить индивидуальный подбор тромбоцитарной массы в целях увеличения эффективности переливания тромбоцитов.

Результаты мониторинга пациентов 3-й группы

В 3-ю группу были включены пациенты с наиболее тяжелыми посттрансплантационными осложнениями, такими как судорожные приступы, септические осложнения, инфекционные поражения легких. У данных пациентов уже в начале этапа кондиционирования наблюдалась тромбоцитопения ($< 20 \times 10^9/\text{л}$). На протяжении всего времени мониторинга отмечалась выраженная трансфузионная зависимость. У пациентки М. на +18-е сутки отмечена гипофункция тромбоцитарного роста. За время всего мониторинга не наблюдалось значимого подъема относительного уровня IPF (рисунок 8), что подтверждает данное заключение.

У пациента Б. за все время мониторинга не наблюдалось значимого подъема относительного уровня IPF, что говорит о гипофункции/отторжении трансплантата (рисунок 9).

Мониторинг пациентов 3-й группы показал, что при гипофункции тромбоцитарного роста не происходит значимого подъема относительного уровня IPF. Множественные трансфузии тромбомассы дают картину постоянно изменяющегося уровня тромбоцитов и относительного уровня IPF, что затрудняет

Рисунок 7

Мониторинг абсолютного уровня IPF и тромбоцитов пациента Ч.
Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 7

The monitoring of the absolute IPF count and platelet count in the patient Ch.
The arrow indicates the day of transplantation, triangle markers indicate the days of platelet transfusion

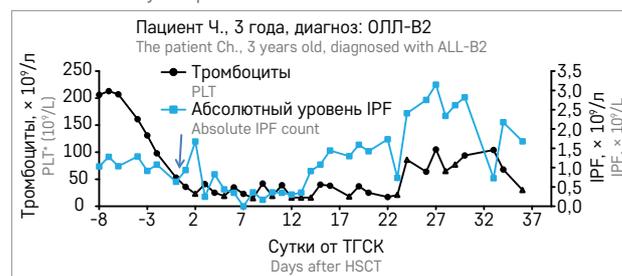


Рисунок 8

Мониторинг относительного уровня IPF и тромбоцитов пациентки М.
Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 8

The monitoring of the IPF percentage and platelet count in the patient M.
The arrow indicates the day of transplantation; triangle markers indicate the days of platelet transfusion

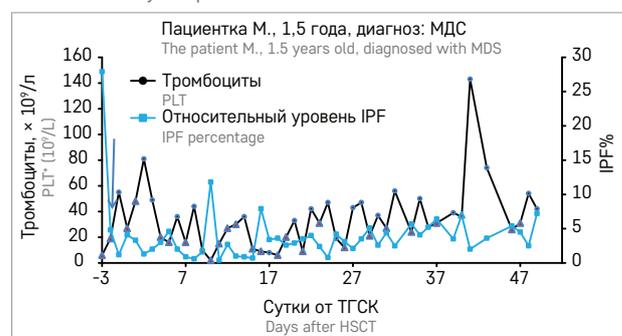
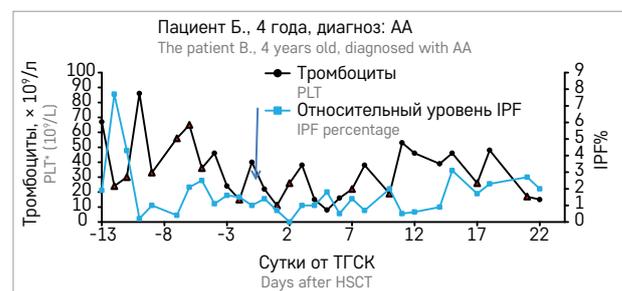


Рисунок 9

Мониторинг относительного уровня IPF и тромбоцитов пациента Б.
Стрелкой обозначен день миелоинфузии, треугольным маркером – дни введения тромбоконцентрата

Figure 9

The monitoring of the IPF percentage and platelet count of the patient B.
The arrow indicates the day of transplantation; triangle markers indicate the days of platelet transfusions



использование гематологического показателя IPF для оценки приживления трансплантата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Параметр IPF обладает большой клинической значимостью, дает возможность более раннего диагностирования приживления тромбоцитарного ростка, нежели в случае, когда единственным критерием является уровень тромбоцитов. Одновременное определение тромбоцитов и IPF дает возможность более рационально принимать решения о переливании тромбомассы.

Отсутствие роста числа тромбоцитов при одновременном повышении IPF > 6% может служить

критерием к назначению скрининга антитромбоцитарных антител и индивидуальному подбору тромбоцитов, а также отсутствие положительной динамики показателя IPF в посттрансплантационном периоде может свидетельствовать об отсутствии приживления тромбоцитарного ростка.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

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

Литература

1. Shevchenko J.L., Kuznetsov A.N., Ionova T.I., Melnichenko V.Y., Fedorenko D.A., Kartashov A.V., et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in multiple sclerosis. *Exp Hematol* 2012; 40 (11): 892–8.
2. Мадзаев С.Р. Правила назначения переливания тромбоцитов: новые доказательства. *Трансфузиология* 2013; 13 (8): 52–5.
3. Протопопова Е.Б., Мочкин Н.Е., Мадзаев С.Р., Мельниченко В.Я., Жибурт Е.Б. Переливание тромбоцитов при трансплантации аутологичных стволовых клеток. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова* 2015; 10 (2): 84–5.
4. Ancliff P.J., Machin S.J. Trigger factors for prophylactic platelet transfusion. *Blood Rev* 1998; 12 (4): 234–8.
5. Briggs C., Hart D., Kunka S., Oguni S., Machin S.J. Immature platelet fraction measurement: A future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006; 16 (2): 101–9.
6. Parker-Williams J. Immunoplatelet counting: platelet transfusions. *Br J Haematol* 2003; 123 (4): 750–1.
7. Ko Y.J., Kim H., Hur M., Choi S.G., Moon H.-W., Yun Y.-M., Hong S.N. Establishment of reference interval for immature platelet fraction. *Int J Lab Hematol* 2013; 35 (5): 528–33.
8. Maenhout T.M., Dierick J., Thomas M., Barbara L., Lies B., Dierick J. Immature platelet fraction (IPF%) in a routine clinical laboratory: (pre)analytical and clinical evaluation Immature platelet fraction (IPF%) in a routine clinical laboratory: (pre)analytical and clinical evaluation. *IPF and ITP*. 2011.
9. Naz A., Mukry S.N., Shaikh M.R., Bukhari A.R., Shamsi T.S. Importance of immature platelet fraction as predictor of immune thrombocytopenic purpura. *Pakistan J Med Sci* 2016; 32 (3): 575–9.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 28.08.2023
Принята к печати 12.09.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-94-102

Опыт применения велаглюцеразы альфа у детей с болезнью Гоше 1-го типа в России

Г.Б. Мовсисян¹, К.В. Савостьянов¹, А.А. Пушков¹, Н.Н. Мазанова¹, Д.В. Хазыкова¹, А.И. Фирумянц¹, А.С. Потапов^{1,2}, А.П. Фисенко¹

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

²ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»

Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Контактная информация:

Мовсисян Гоар Борисовна,
канд. мед. наук, старший научный
сотрудник лаборатории редких
наследственных болезней у детей
Медико-генетического центра
ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»
Минздрава России
Адрес: 119991, Москва,
Ломоносовский просп., 2, стр. 1
E-mail: movsisyan@nczd.ru

На современном этапе «золотым стандартом» лечения болезни Гоше 1-го типа у детей является ферментная заместительная терапия. Оценка эффективности и безопасности лечения велаглюцеразой альфа в педиатрической когорте больных ограничена лишь несколькими крупными исследованиями. В отечественной литературе не обнаружено публикаций по опыту применения велаглюцеразы альфа у «наивной» группы пациентов с болезнью Гоше 1-го типа. Цель исследования: оценить эффективность и безопасность применения велаглюцеразы альфа у детей с болезнью Гоше 1-го типа. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. От пациентов и/или их законных представителей было получено информированное согласие на проведение исследования. Оценку эффективности терапии велаглюцеразой альфа у детей с болезнью Гоше 1-го типа проводили путем анализа данных мониторинга 15 пациентов в возрасте от 2 до 15 лет, занесенных в Российский педиатрический регистр болезни Гоше на базе ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период 2015–2023 гг. Все пациенты на момент инициации лечения ранее не получали ферментную заместительную терапию. Медиана возраста начала лечения составила 6,5 года. Проводился учет антропометрических, лабораторных и инструментальных данных на точках 0, 6, 12, 24 и 36 мес. Доза ферментной заместительной терапии на момент инициации с учетом тяжести течения заболевания варьировала от 30 до 60 ЕД/кг с медианой 43 ЕД/кг на введение 1 раз в 2 нед. Уже через 6 мес от начала применения велаглюцеразы альфа у детей с болезнью Гоше 1-го типа отмечены статистически значимые улучшения всех показателей ($p < 0,001$): нормализация медианы концентрации гемоглобина (со 113 до 125 г/л) и количества тромбоцитов (со 111 до 163×10^9 /л), сокращение степени увеличения объемов печени с 45,1 до 17,9% и селезенки с 39,4 до 15,5%, линейных размеров правой доли печени с 27,2 до 11,1%, длины и ширины селезенки с 73,4 до 37,8% и с 60,3 до 17,5% соответственно. При анализе активности биомаркеров гликозилсфингозина и хитотриозидазы уже через 1 год от начала терапии отмечено достоверное снижение значений, а к 3-му году лечения получено выраженное снижение медианы показателей с 204,0 (117,6; 359,2) до 35,3 (13,1; 133,6) нг/мл и с 2699 (1364; 8863,5) до 227 (287,5; 1367,5) нмоль/мл/ч соответственно ($p < 0,001$). Нежелательных явлений за период терапии не зарегистрировано. Таким образом, своевременно назначенная регулярная ферментная заместительная терапия велаглюцеразой альфа при адекватном режиме дозирования уже через 6 мес и 1 год от начала лечения позволяет достигнуть нормализации концентрации гемоглобина и количества тромбоцитов, снижения активности биомаркеров и сокращения увеличенных размеров печени и селезенки у детей с болезнью Гоше 1-го типа. К 3-му году лечения отмечается достижение ключевых целей терапии в виде купирования анемии и тромбоцитопении, практически полного регресса гепатоспленомегалии, нормализации денситометрических показателей минеральной плотности костей и длины тела по отношению к возрасту ребенка.

Ключевые слова: дети, болезнь Гоше, ферментная заместительная терапия, велаглюцераза альфа

Мовсисян Г.Б. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 94–102. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-94-102

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 28.08.2023
Accepted 12.09.2023

Velaglucerase alfa for treatment in children with Gaucher disease type 1: the Russian experience

G.B. Movsisyan¹, K.V. Savost`yanov¹, A.A. Pushkov¹, N.N. Mazanova¹, J.V. Khazykova¹, A.I. Firumyants¹, A.S. Potapov^{1,2}, A.P. Fisenko¹

¹National Medical Research Center for Children's Health of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (the Sechenov University), Moscow

The current gold standard for the treatment of Gaucher disease type 1 in children is enzyme replacement therapy. The efficacy and safety of treatment with velaglucerase alfa have been assessed in only a few large studies involving pediatric patients as subjects of research. In the Russian literature, there are no data available on the use of velaglucerase alfa in drug-naïve patients with Gaucher disease type 1. The aim of our study was to assess the efficacy and safety of treatment with velaglucerase alfa in children with Gaucher disease type 1. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the National Medical Research Center for Children's Health of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. All patients and/or their legal representatives gave their informed consent to the study. The efficacy of treatment with velaglucerase alfa in children with Gaucher disease type 1 was assessed by analyzing monitoring data of 15 patients aged 2 to 15 years who had been registered in the Russian Pediatric Gaucher Registry established at National Medical Research Center for Children's Health of Ministry of Healthcare of Russia over the period from 2015 to 2023. None of the patients had ever undergone enzyme replacement therapy before they were included in this study. The median age at the start of treatment was 6.5 years. We analyzed the patients' anthropometric, laboratory and instrumental data at 0, 6, 12, 24 and 36 months. The initial dose of enzyme replacement therapy ranged from 30 to 60 units/kg (with the median of 43 units/kg per infusion) once every 2 weeks based on disease severity. In as little as 6 months after the initiation of therapy with velaglucerase alfa, patients with Gaucher disease type 1 showed a statistically significant improvement in all measured parameters ($p < 0.001$): normalization of the median hemoglobin concentration and platelet count (from 113 to 125 g/L and from 111 to 163 × 10⁹/L, respectively); a reduction in degree of liver and spleen enlargement (in terms of volume, from 45.1 to 17.9% and from 39.4 to 15.5%, respectively); a reduction in degree of the right liver lobe enlargement (in terms of linear measurements, from 27.2 to 11.1%); a reduction in degree of spleen enlargement (in terms of its length and width, from 73.4 to 37.8% and from 60.3 to 17.5%, respectively). Our patients had a remarkable decrease in biomarker activity after 3 years of therapy: chitotriosidase activity decreased from 2699 to 227 nmol/mL/h and glucosylsphingosine level was reduced from 204.0 to 35.3 ng/mL ($p < 0.001$). There were no adverse events during the course of treatment. After 6 months and 1 year of regular enzyme replacement therapy with appropriate doses of velaglucerase alfa initiated in a timely manner, children with Gaucher disease type 1 achieve normal hemoglobin concentrations and platelet counts, a reduction in biomarker activity, and a decrease in liver and spleen volumes. After 3 years of enzyme replacement therapy, patients achieve their main therapeutic goals such as the resolution of anemia and thrombocytopenia, an almost complete regression of hepatosplenomegaly and the normalization of bone mineral density and height adjusted for age.

Key words: children, Gaucher disease, enzyme replacement therapy, velaglucerase alfa

Movsisyan G.B., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 94–102.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-94-102

Блезнь Гоше (БГ) – наиболее распространенная лизосомная болезнь накопления с аутосомно-рецессивным типом наследования, возникающая вследствие мутаций в гене *GBA*, приводящих к снижению активности глюкоцереброзидазы (β -D-глюкозидазы). Количественный и качественный дефицит лизосомного фермента приводит к накоплению патологического субстрата глюкоцереброзида в клетках ретикулоэндотелиальной системы с развитием полиорганного поражения [1, 2].

Исторически по наличию или отсутствию, тяжести и скорости прогрессирования неврологической симптоматики выделяют 3 основных клинических типа БГ. Отсутствие поражения центральной нервной системы предопределяет развитие БГ 1-го типа, которая является наиболее распространенной формой заболевания с частым дебютом в детском возрасте [1, 2].

Симптомы БГ 1-го типа варьируют, но преимущественно включают анемию, тромбоцитопению, гепатоспленомегалию и нередко вовлечение костно-суставной системы в виде задержки линейного роста, костных болей и костных кризов, снижения минеральной плотности костной ткани (МПКТ) с высоким риском патологических переломов [1]. В связи с этим на современном этапе целевые точки терапии БГ направлены на купирование цитопенического синдрома, сокращение размеров печени и селезенки, предупреждение формирования необратимых изменений костно-суставной системы, других жизненно важных органов (печень, легкие, почки) и улучшение качества жизни пациентов. В педиатрической когорте пациентов дополнительным критерием является предотвращение задержки физического и полового развития ребенка [1–4].

«Золотым стандартом» лечения БГ 1-го типа у детей в настоящее время является регулярная ферментная заместительная терапия (ФЗТ). В 60–70-е гг. XX в. De Duve и Brady первые высказали идеи о возможности лечения лизосомных болезней накопления с помощью ФЗТ. Результаты многочисленных исследований привели к регистрации в 1991 г. альглюцеразы (Цередаза, Genzyme, США) – первого препарата для ФЗТ, получаемого из клеток плаценты [3–5].

В настоящее время в Российской Федерации доступны 3 препарата для ФЗТ: человеческая рекомбинантная имиглюцераза, велаглюцераза альфа и талиглюцераза альфа.

Разработка велаглюцеразы альфа была начата в США компанией Shire еще в 1996 г. После многочисленных клинических исследований в феврале 2010 г. препарат, вышедший под торговым названием ВПРИВ, был одобрен к применению в США у пациентов с БГ 1-го типа. Чуть позже, в августе 2010 г., препарат был разрешен к использованию в Европе. В январе 2013 г. ВПРИВ зарегистрирован в России и включен в Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с БГ. Велаглюцераза альфа производится с использованием человеческой линии клеток, в отличие от имиглюцеразы аминокислотная последовательность у препарата идентична эндогенной глюкоцереброзидазе и имеет более длинные цепи гликанов, содержащие большее количество маннозы, что облегчает его интернализацию макрофагами. Велаглюцераза альфа возмещает или замещает β -D-глюкозидазу, снижает накопление глюкоцереброзидов, которое приводит к изменениям, характерным для БГ [3–5].

Correspondence:

Goar B. Movsisyan,
Cand. Med. Sci., a senior researcher
at the Laboratory of Rare Hereditary
Diseases in Children, Medical
Genetics Center, National Medical Research
Center for Children's Health of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 2, building 1,
Lomonosovskiy Avenue, 119991, Moscow
E-mail: movsisyan@nczd.ru

У пациентов с БГ было продемонстрировано, что ФЗТ уменьшает гепатоспленомегалию, повышает концентрацию гемоглобина и количество тромбоцитов, улучшает МПКТ, снижает частоту переломов костей, ускоряет рост, а также улучшает качество жизни детей. Преимущества данного вида лечения были установлены как в клинических испытаниях, так и в реальных регистрационных исследованиях [4, 5].

Четыре клинических испытания велаглюцеразы альфа III фазы и их продолжение продемонстрировали улучшение по сравнению с исходным уровнем концентрации гемоглобина, количества тромбоцитов и объемов печени и селезенки у пациентов, ранее не получавших лечения, и стабильное течение заболевания у пациентов, получавших предшествующую терапию имиглюцеразой [6–9]. По данным международных регистров, среди 3 препаратов для ФЗТ в педиатрической когорте пациентов наиболее распространено применение велаглюцеразы альфа [1].

Таким образом, в настоящее время есть лишь несколько крупных американских и европейских публикаций по применению велаглюцеразы альфа в педиатрической группе пациентов, ранее не получавших лечение. Необходимы дополнительные исследования эффективности и безопасности долгосрочной ФЗТ у детей с БГ 1-го типа для определения оптимальной стратегии их мониторинга и сроков достижения целевых точек лечения.

Цель исследования – оценка эффективности и безопасности применения велаглюцеразы альфа у детей с БГ 1-го типа и дополнение данных по опыту использования данного препарата в педиатрической когорте пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено ретроспективное одномоментное исследование с анализом базы данных по лечению детей с БГ 1-го типа с оценкой эффективности ФЗТ велаглюцеразой альфа. В исследование были включены данные о лечении детей с БГ, регулярно наблюдавшихся в гастроэнтерологическом отделении ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с 2015 по 2023 г. Проведен анализ динамики клинических и лабораторно-инструментальных параметров с контрольными точками лечения 0, 6, 12, 24 и 36 мес. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Формирование групп

В период с марта 2015 г. по апрель 2023 г. в гастроэнтерологическое отделение ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России были госпитализированы 15 детей с БГ 1-го типа в возрасте от 2 до 15 лет,

которым была инициирована терапия велаглюцеразой альфа. Диагноз БГ был установлен в соответствии с международными и российскими клиническими рекомендациями на основании снижения активности глюкоцереброзидазы и молекулярно-генетического подтверждения.

Критерии включения:

- подтвержденный диагноз БГ по данным энзимодиагностики и/или молекулярно-генетического исследования;
- дети с БГ 1-го типа;
- регулярное введение велаглюцеразы альфа в дозе 30–60 ЕД/кг внутривенно капельно 1 раз в 2 нед;
- отклонение от нормы не менее 3 из 4 ключевых показателей: гемоглобин менее 110 г/л, тромбоциты менее 150×10^9 /л, увеличение линейных размеров печени и селезенки в процентном соотношении к нормальным значениям, рассчитанным по росту ребенка;
- контроль эффективности терапии при первом визите и далее через 6, 12, 24 и 36 мес от начала лечения.

Критерии невключения:

- дети с нейронопатическими формами БГ (2-й и 3-й типы);
- дети с БГ, получающие лечение менее 3 лет;
- дети с БГ 1-го типа, получавшие лечение имиглюцеразой или талиглюцеразой альфа;
- дети с БГ 1-го типа с удаленной селезенкой;
- возраст старше 18 лет.

Критерии исключения:

- нерегулярное введение препарата;
- введение препарата в дозе менее 30 ЕД/кг и более 60 ЕД/кг;
- контроль эффективности лечения реже 1 раза в год.

Схема формирования основной выборки исследования представлена на *рисунке*.

Целевые показатели исследования

Оценку эффективности ФЗТ проводили согласно современным клиническим рекомендациям по ведению детей с БГ, в соответствии с которыми выполняли анализ концентрации гемоглобина и количества тромбоцитов по клиническому анализу крови, объемов и линейных размеров печени и селезенки (по магнитно-резонансной томографии (МРТ) и ультразвуковому исследованию (УЗИ) органов брюшной полости), антропометрическую оценку физического развития (значение Z-score длины тела к возрасту (HAZ) по шкалам WHO anthro plus), определяли МПКТ (Z-критерий) по данным остеоденситометрии поясничного отдела позвоночника.

Дополнительные показатели исследования

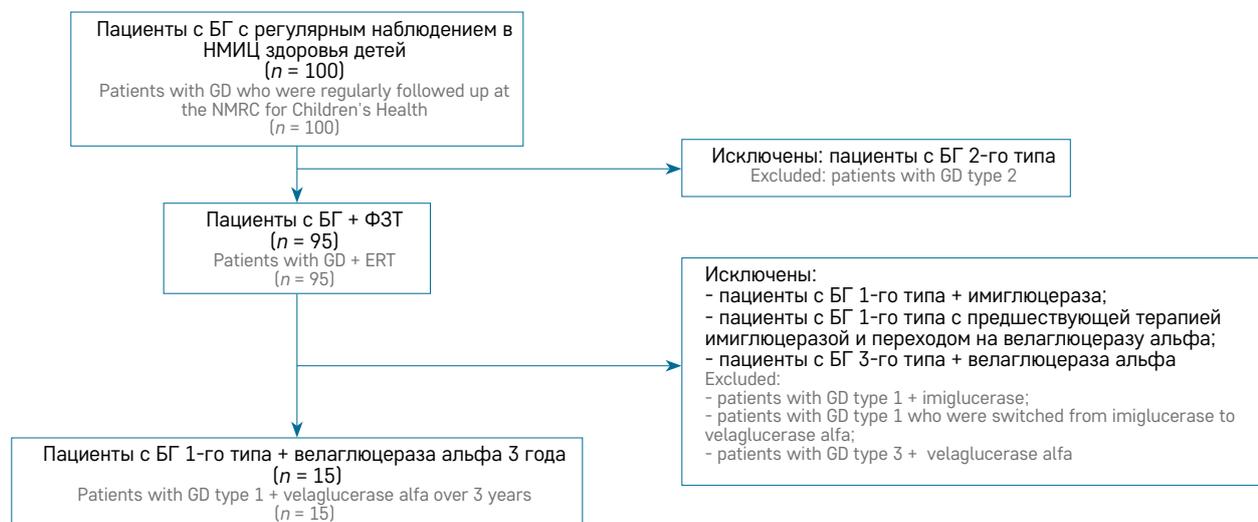
В качестве дополнительных исходов были проанализированы активность гликозилсфингозина (LysoGb-1) и хитотриозидазы как важнейших биомаркеров активности БГ.

Рисунок

Схема формирования основной выборки исследования (пациенты с БГ 1-го типа без предшествующей ФЗТ и на терапии велаглюцеразой альфа в течение 3 лет)

Figure

Flowchart of patient enrollment (patients with Gaucher disease (GD) type 1 who received no previous enzyme replacement therapy (ERT) and were treated with velaglugerace alfa over 3 years)

**Методы измерения целевых показателей**

Диагноз БГ всем пациентам был подтвержден путем энзимодиагностики и/или молекулярно-генетического исследования. Энзимодиагностика для верификации диагноза (определение активности глюкоцереброзидазы и хитотриозидазы) проведена на базе лабораторий медицинской геномики НМИЦ здоровья детей и наследственных болезней обмена веществ Медико-генетического научного центра (Москва). Определение мутаций в гене *GBA1* (ген глюкоцереброзидазы) проведено на базе лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии НМИЦ здоровья детей. БГ 1-го типа была установлена пациентам в соответствии с исторически принятой классификацией и согласно международным клиническим рекомендациям на основании отсутствия специфической неврологической симптоматики. Оценку эффективности терапии велаглюцеразой альфа проводили по данным, полученным из Российского педиатрического регистра пациентов с БГ, созданного на базе НМИЦ здоровья детей в 2016 г. с применением программного обеспечения MySQL (корпорация Oracle, США). Эффективность лечения определяли по динамике гематологических и висцеральных параметров, показателей МПКТ и физического развития. Клинико-лабораторные и инструментальные критерии оценки включали значение HAZ, концентрацию гемоглобина, количество тромбоцитов, активность LysoGb-1 и хитотриозидазы, объемы и линейные размеры ширины и длины селезенки и правой доли печени, Z-score МПКТ.

В исследование были включены следующие лабораторные показатели:

- общий анализ крови: гемоглобин, тромбоциты;
- биомаркеры БГ: LysoGb-1 и хитотриозидаза.

Исследование клинического анализа крови проводили у детей натошак методом проточной гемцитометрии с помощью автоматического анализатора Sysmex XN 1000 (Япония), скорость оседания эритроцитов определяли с помощью аналога метода Вестергрена на автоматическом анализаторе Roller Alifax (Италия) в Централизованной клинико-диагностической лаборатории и лаборатории экспериментальной иммунологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Оценку динамики биомаркеров проводили 1 раз в год в соответствии с клиническими рекомендациями по мониторингу показателей.

За анемию у ребенка принимали значение концентрации гемоглобина менее 110 г/л, за тромбоцитопению – количество тромбоцитов менее $150 \times 10^9/\text{л}$.

МПКТ определяли путем остеоденситометрии поясничного отдела позвоночника на цифровом рентгеновском костном денситометре LUNAR iDXA (GE Healthcare, США). Подсчет показателя Z-score проводился автоматически с учетом костного возраста, роста и веса ребенка. Оценку костного возраста осуществляли по данным рентгенографии кистей.

Объемы печени и селезенки по данным МРТ рассчитывали по ранее разработанным формулам [10, 11]. Линейные размеры печени и селезенки определяли путем УЗИ органов брюшной полости по стандартной методике. Оценка результатов проводилась с таблицей размеров печени и селезенки у детей в зависимости от роста ($M \pm \sigma$) по М.И. Пыкову.

Степень увеличения органов оценивали в процентах (%) по отношению к норме [12].

Описание медицинского вмешательства

Терапия велаглуцеразой альфа проводилась по месту жительства и в домашних условиях под медицинским наблюдением в соответствии с инструкцией по применению препарата [13]. Все пациенты получали препарат внутривенно капельно в течение 1 ч 1 раз в 2 нед. Оценка эффективности лечения проводилась с регулярной частотой (1 раз в 6–12 мес) в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в соответствии с российскими и международными протоколами по мониторингу детей с БГ.

На основании данных обследования и лечения пациентов, наблюдавшихся с 2006 г., в 2016 г. был сформирован Регистр детей с БГ, в соответствии с которым в 2023 г. проведена оценка эффективности долгосрочной ФЗТ.

Статистические методы

Размер выборки для основной группы и группы сравнения предварительно не рассчитывали.

Анализ данных выполнен с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics, версия 26.0 (IBM Software, США). Описание количественных данных выполнено в виде абсолютных величин, процентов, медианы (Me) и квартилей (Q25; Q75). Количественные признаки в парных (до/после лечения) выборках сравнивали с помощью критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено независимым локальным этическим комитетом НМИЦ здоровья детей (протокол №11 от 17.12.2013). Включение в исследование сведений о результатах обследования осуществляли после подписания законным представителем и пациентом старше 14 лет информированного добровольного согласия на обработку данных.

Ограничения исследования

Известно, что недостаточный (малый) размер выборки в сравнительных исследованиях является причиной низкой показательности используемых статистических критериев, не позволяя, таким образом, выявить различия там, где они есть. Можно предположить, что и в нашем исследовании размер выборки был недостаточным. Следует отметить и ограниченную репрезентативность госпитальных выборок больных. Результаты таких исследований не могут быть с уверенностью экстраполированы на генеральную совокупность пациентов, в нашем случае – пациентов с БГ.

К ограничениям исследования следует отнести его ретроспективный характер.

В исследовании не определяли динамику линейного размера левой доли печени, так как у большинства пациентов с БГ 1-го типа она исходно была в пределах нормы и, соответственно, не являлась показательным критерием для определения ответа на лечение.

Оценка динамики МПКТ не была проведена в ряде точек в связи с малым календарным возрастом ребенка или костным возрастом менее 5 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты (участники) исследования

В исследование были включены данные о 15 детях с БГ 1-го типа, из них 8 (53%) – девочки. Медиана возраста дебюта заболевания составила 3,0 (1,0; 8,0) года, возраста диагностики – 6,5 (2,9; 12,0) года, возраста начала лечения – 6,8 (3,0; 12,2) года. Таким образом, период от момента первых клинических проявлений до инициации терапии составил 3,8 года. Согласно международным клиническим рекомендациям, подобранная доза ФЗТ у пациентов была не менее 30 ЕД/кг и не более 60 ЕД/кг, медиана дозы велаглуцеразы альфа составила 43 (35; 45) ЕД/кг. Генотипирование проведено у всех пациентов, наиболее часто встречалась мутация *p.N370S* ($n = 10$; 66,7%), которая у 2 детей была представлена в гомозиготном состоянии, а у остальных – в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими мутациями. Второй по частоте была мутация *p.L444P* ($n = 7$; 46,7%), причем в 6 случаях в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *p.N370S*. Таким образом, группа пациентов была достаточно однородной по генетическому профилю.

До 60% пациентов через 6 мес после инициации терапии в стационарных условиях получали инфузии велаглуцеразы альфа в домашних условиях в соответствии с инструкцией по введению препарата.

Основные результаты исследования

Через 3 года от начала ФЗТ у пациентов отмечено существенное улучшение ключевых параметров оценки эффективности лечения.

Как показано в таблице, уже через 6 мес от начала терапии отмечено значимое повышение медианы концентрации гемоглобина со 113 (99; 121) до 125 (119; 138) г/л и количества тромбоцитов со 111 (68; 123) до 163 (154; 255) $\times 10^9$ /л ($p < 0,001$). К 3-му году лечения показатели гемоглобина и тромбоцитов находились в пределах нормы у 100% и 86% пациентов соответственно. Следует отметить, что наиболее выраженное нарастание значения показателей отмечено в первые 6–12 мес терапии, в даль-

Таблица

Динамика клинико-лабораторных и инструментальных параметров на фоне терапии велаглюцеразой альфа у детей с БГ 1-го типа в течение 3 лет (Me (Q25; Q75))

Table

Changes in clinical, laboratory and instrumental findings in children with GD type 1 treated with velaglycerase alfa over 3 years (Me (Q25; Q75))

Параметр Parameter	Длительность терапии, мес Duration of treatment, months				
	0	6	12	24	36
HAZ	-0,6 (-1,1; -0,2)	-0,5 (-1,0; 0,6)	-0,4 (-0,54; -0,1)	-0,3 (-0,8; -0,2)	0,0 (-0,8; 1,1)*
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	113 (99; 121)	125 (119; 138)*	134 (120; 138)*	129 (124; 136)*	127 (123; 129)*
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л Platelets, $\times 10^9$ /L	111 (68; 123)	163 (154; 255)*	253 (164; 319)*	257 (163; 298)*	248 (171; 278)*
LysoGb-1, нг/мл LysoGb-1, ng/mL	204 (117,6; 359,2)	–	184,6 (107,9; 368,3)*	167,9 (37,6; 177,6)*	35,3 (13,1; 133,6)*
Хитотриозидаза, нмоль/мл/ч Chitotriosidase, nmol/mL/h	2699 (1364; 8863,5)	–	2138 (1010; 4428)*	345 (290; 1405)*	227 (287,5; 1367,5)*
Печень Liver					
Объем, % увеличения от нормы Volume, an increase above normal, %	45,1 (33,3; 69,3)	17,9 (12,5; 28,2)*	25,8 (2,2; 33,4)*	16,1 (0,0; 49,0)*	6,9 (1,2; 28,5)*
Правая доля, % увеличения от нормы Right lobe, an increase above normal, %	27,2 (10,4; 36,9)	11,1 (3,65; 27,7)*	13,9 (4,2; 25,4)*	10,9 (5,5; 17,9)*	7,5 (3,5; 11,1)*
Селезенка Spleen					
Объем, % увеличения от нормы Volume, an increase above normal, %	39,4 (19,4; 68,8)	15,5 (0,0; 80)*	17,3 (0,0; 60,1)*	10,0 (0,0; 42,0)*	8,0 (1,0; 20,0)*
Длина, % увеличения от нормы Length, an increase above normal, %	73,4 (57,8; 143,6)	37,8 (26,3; 48,6)*	29,5 (3,8; 50,1)*	20,4 (4,2; 38,5)*	18,0 (2,8; 30,1)*
Ширина, % увеличения от нормы Width, an increase above normal, %	60,3 (27,8; 110)	17,5 (5,4; 74,0)*	10,5 (0,5; 41,7)*	16,5 (12,8; 34,6)*	12,9 (1,7; 21,8)*
МПКТ, Z-score BMD, Z-score	-0,8 (-1,7; 0,0)	-0,6 (-1,5; 0,4)*	-0,5 (-1,2; 0,5)*	-0,4 (-1,0; 0,5)*	-0,3 (-0,9; 0,6)*

Примечание. * – $p < 0,05$ от исходного значения.

Note. HAZ – height-for-age Z-score; BMD – bone mineral density; * – $p < 0.05$ from baseline.

нейшем концентрация гемоглобина и количество тромбоцитов оставались в пределах достигнутых значений.

При анализе активности биомаркеров LysoGb-1 и хитотриозидазы уже через 1 год от начала терапии отмечено достоверное снижение значений, а к 3-му году лечения получено выраженное снижение медианы показателей с 204,0 (117,6; 359,2) до 35,3 (13,1; 133,6) нг/мл и с 2699 (1364; 8863,5) до 227 (287,5; 1367,5) нмоль/мл/ч соответственно ($p < 0,001$).

При оценке ответа на лечение паренхиматозных органов на фоне 3-летней ФЗТ по данным МРТ органов брюшной полости по сравнению с исходной степенью увеличения от нормы отмечено значимое сокращение объемов печени и селезенки на 38,2% и 31,4% соответственно, по данным УЗИ органов брюшной полости – линейных размеров длины и ширины селезенки на 55,4% и 47,4% соответственно и правой доли печени на 16,1% ($p < 0,001$). Следует отметить, что выраженная положительная динамика по регрессу гепатоспленомегалии отмечена уже через 6 мес от начала терапии.

Анализ динамики показателя HAZ выявил, что исходно у 2 (13,3%) из 15 пациентов его значения были менее -2,5, и у 2 (13,3%) – менее -1,0, а через 3 года от начала терапии только у 1 ребенка зарегистрировано значение менее -1,0 и ни у одного не отмечено менее -2,5.

При оценке динамики медианы Z-score МПКТ 3 (30%) пациента с исходным показателем менее -1,5 достигли нормальных значений к 3-му году терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное исследование показало положительную динамику изменений гематологических, висцеральных, костных и физических показателей у детей с БГ 1-го типа на фоне непрерывной патогенетической терапии велаглюцеразой альфа в адекватном режиме дозирования.

БГ первая патология из группы лизосомных болезней накопления, для которой в 1991 г. было разработано эффективное патогенетическое лечение в виде ФЗТ. На современном этапе препараты для терапии БГ на фоне практически полного

отсутствия побочных эффектов позволяют купировать ключевые проявления заболевания, тем самым нормализуя параметры качества жизни пациентов [1, 2, 5].

С января 2013 г. в Российской Федерации зарегистрирован второй препарат для патогенетического лечения БГ велаглуцераза альфа (Такеда, США) – аналог эндогенной глюкоцереброзидазы, производимый методом генной активации на человеческой линии клеток и приводящий к обратному развитию патологического поражения органов, восстановлению их функций [5].

Велаглуцераза альфа является стандартом лечения БГ 1-го типа с опытом клинического применения свыше 20 лет более чем у 5000 пациентов [14–16]. Оценка гематологического и органного ответа, а также костных изменений является стандартным минимальным критерием эффективности терапии при БГ в повседневной практике. Мониторинг заболевания у детей на фоне патогенетической терапии проводится в соответствии с международными и российскими клиническими рекомендациями по минимально необходимому контролю состояния пациентов [1, 2, 15]. Уникальность проведенного исследования в нашей стране и его вклад в анализ эффективности патогенетического лечения БГ в мировой практике обоснован наличием лишь единичных оригинальных ретроспективных исследований с четкими критериями мониторинга заболевания у детей, которые не включали российских пациентов.

Исследуемая нами группа пациентов не отличалась по гендерному признаку. Анализ результатов молекулярно-генетического исследования показал, что мутация *p.N370S* и генотип *p.N370S/p.L444P* являются наиболее распространенными среди российских пациентов с БГ 1-го типа, что соответствует данным международных исследований [1, 2]. Многообразие сочетаний мутации *p.N370S* с другими аллелями, возможно, вносит свой частичный вклад в неоднородность клинических проявлений БГ и вариабельность клинического ответа, что требует дальнейшего изучения. По данным проведенного нами исследования, на фоне 3-летней ФЗТ отмечено достоверное улучшение ключевых критериев оценки эффективности лечения, что сопоставимо с международными данными.

Большинство пациентов через 6 мес от начала терапии получали ее в домашних условиях. Elstein и соавт. в 2016 г. представили опыт введения препарата вне стационара под наблюдением медицинской сестры, который характеризовался высоким профилем безопасности и был более комфортным для повседневной жизни пациентов [13].

На основании 12-месячного исследования III фазы ТКТ-032 (2007 г.) и 9-месячного исследования III фазы HGT-GCB-039 (2008 г.) G. Pastores и P. Giraldo и соавт. (2012, 2014) была проведена оценка эффективности и безопасности лечения велаглуцеразой альфа в течение 2 лет в педиатрической группе пациентов ($n = 6$). Дети получали препарат в дозе 60 ЕД/кг в течение 12 и 9 мес, затем продолжили лечение в открытом исследовании HGT-GCB-044 в прежней дозе и режиме на протяжении еще 15 мес. Средний возраст пациентов составил 9 (7–15) лет, 1 ребенок был с удаленной селезенкой [17, 18]. В наше исследование были включены 15 «наивных» пациентов, не отличавшихся по гендерному признаку, с медианой возраста инициации терапии 6,8 года.

Основные изменения клинических параметров от исходных значений через 1 и 2 года терапии были следующими: концентрация гемоглобина – 190 (149; 231) г/л и 250 (186; 314) г/л соответственно, повышение количества тромбоцитов на 72,1% и 95,3% соответственно, сокращение объема селезенки от исходного ($n = 5$) на 60,4% и 69,5% соответственно, объема печени – на 26,3% и 29,1% соответственно. Кроме того, отмечено снижение активности хитотриозидазы и хемокина CCL18. Помимо 4 основных показателей в педиатрической группе был также оценен параметр роста. Три пациента, у которых рост в исходной точке был менее 5-го перцентиля, улучшили свои показатели к концу исследования, еще 3 ребенка, имевшие значения роста выше 5-го перцентиля, сохранили свои параметры выше этого уровня на протяжении всего исследования. У 95% детей с БГ 1-го типа на фоне длительной ФЗТ велаглуцеразой альфа отмечено улучшение МПКТ: Z-score 1,21 (0,80–1,62). Таким образом, в педиатрической группе пациентов на фоне 2-летней терапии препаратом велаглуцераза альфа были установлены его хорошая переносимость и улучшение всех ключевых клинических параметров. Ни у кого из детей не отмечено образования антител к велаглуцеразе альфа [5, 17, 18].

В нашем исследовании отмечена нормализация медианы концентрации гемоглобина через 1 и 2 года терапии – 134 (120; 138) г/л и 129 (124; 136) г/л соответственно, более чем у 80% пациентов – числа тромбоцитов, значимый регресс гепатоспленомегалии зафиксирован уже через 6 мес терапии.

При оценке уровня биомаркеров мы исследовали динамику LysoGb-1 и хитотриозидазы, значения которых выражено снизились к 3-му году терапии.

В настоящее время LysoGb-1 является наиболее чувствительным и специфическим маркером для мониторинга БГ, коррелирующим как с цитопенией, органомегалией, так и с генотипом пациентов [19, 20].

В исследовании Elstein и соавт., как и по нашим результатам, через 4 года от начала терапии у 22 «наивных» детей было показано снижение значения с 323,2 до 60,4 нг/мл. По нашим данным, значение LysoGb-1 к 3-му году терапии составило 35,3 нг/мл [21].

В 2012 г. Grabowski и соавт. было проведено исследование по оценке роста, костного возраста и МПКТ у 9 детей, получавших лечение имиглюцеразой, впоследствии включенных в исследования ТКТ-034 и HGT-GCB-044, в которых получали лечение велаглюцеразой альфа в течение 2 лет в той же дозе и при том же режиме введения. По результатам исследования показатели роста сохранились в пределах 74,2–78,5 перцентилей. При оценке МПКТ значение Z-score у всех детей было не менее 0,51 и в дальнейшем значимо не менялось на фоне проводимой терапии [5, 22–24].

В нашем исследовании медиана показателей HAZ и Z-score МПКТ исходно была в пределах нормальных значений, однако у 4 и 3 пациентов соответственно значения, которые были исходно ниже –1, достигли у большинства нормы к 3-му году терапии.

В открытом многоцентровом исследовании HGTGCB-058 Pastores и соавт. провели изучение безопасности препарата у пациентов без лечения или ранее получавших имиглюцеразу. Ни у кого из испытуемых не было отмечено реакций гиперчувствительности или серьезных побочных эффектов на фоне терапии, на основании чего был сделан вывод о хорошей переносимости препарата у лиц, имеющих антитела к имиглюцеразе и велаглюцеразе альфа [5, 23]. В ходе всех проведенных исследований была отмечена хорошая переносимость велаглюцеразы альфа. Профиль безопасности препарата отличался отсутствием серьезных и угрожающих жизни побочных эффектов. Зарегистрированные нежелательные реакции возникали преимущественно на фоне инфузии препарата, характеризовались легкой и средней степенью выраженности и проявлялись в виде головной боли, головокружения, тошноты, катаральных явлений, лихорадки, артралгий. Указанные жалобы быстро купировались на фоне симптоматической терапии [5, 23, 24].

В нашем исследовании ни у одного из пациентов не отмечено инфузионных реакций или серьезных

нежелательных явлений, что подтверждает высокий профиль безопасности ФЗТ велаглюцеразой альфа на фоне долгосрочной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достоверное улучшение исследуемых параметров на фоне ФЗТ значимо влияет на естественное течение БГ.

Внедрение велаглюцеразы альфа в клиническую практику для патогенетической терапии БГ расширило возможности оказания медицинской помощи, особенно в педиатрической когорте пациентов, в связи с высоким профилем эффективности и безопасности препарата.

Полученные нами данные дополнили информацию об опыте применения препарата у детей и служат основанием для дальнейших исследований.

Прерывание лечения на длительное время или неадекватное дозирование препарата приводит к реактивации таких проявлений заболевания, как органомегалия, задержка роста и костные поражения, что отражает хронический прогрессирующий характер БГ. Дальнейший анализ эффективности применения велаглюцеразы альфа необходим на большей выборке больных для прогнозирования оптимальных точек достижения целей терапии и прогноза для жизни пациентов. Исключительно важны раннее иницирование и непрерывный характер ФЗТ для получения адекватного ответа на лечение и поддержания показателей на достигнутом уровне.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Movsisyan G.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2881-4703>

Savost'yanov K.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4885-4171>

Pushkov A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6648-2063>

Mazanova N.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3473-2897>

Khazykova J.V. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3134-9069>

Firumyants A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5282-6504>

Potapov A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4905-2373>

Fisenko A.P. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8586-7946>

Литература

- Weinreb N.J., Goker-Alpan O., Kishnani P.S., Longo N., Burrow T.A., Bernat J.A., et al. The diagnosis and management of Gaucher disease in pediatric patients: Where do we go from here? *Mol Genet Metab* 2022; 136 (1): 4–21. DOI: 10.1016/j.ymgme.2022.03.001
- Гундобина О.С., Комарова Е.В., Намазова-Баранова Л.С., Геворкян А.К., Мовсисян Г.Б. Болезнь Гоше у детей. *Педиатрическая фармакология* 2013; 10 (3): 72–5.
- Sam R., Ryan E., Daykin E., Sidransky E. Current and emerging pharmacotherapy for Gaucher disease in pediatric populations. *Expert Opin Pharmacother* 2021; 22 (11): 1489–503. DOI: 10.1080/14656566.2021.1902989
- Gupta P., Pastores G. Pharmacological treatment of pediatric Gaucher disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018; 11 (12): 1183–94. DOI: 10.1080/17512433.2018.1549486
- Гундобина О.С., Мовсисян Г.Б., Комарова Е.В., Намазова-Баранова Л.С. Эффективность и безопасность применения велaglucеразы альфа у пациентов с болезнью Гоше 1-го типа (по данным международных исследований). *Педиатрическая фармакология* 2014; 11 (6): 52–5. DOI: 10.15690/pf.v11i6.1215
- Zimran A., Pastores G.M., Tylki-Szymanska A., Hughes D.A., Elstein D., Mardach R., et al. Safety and efficacy of velaglucеразе alpha in Gaucher disease type 1 patients previously treated with imiglucеразе. *Am J Hematol* 2013; 88 (3): 172–8. DOI: 10.1002/ajh.23383
- Gonzalez D.E., Turkia H.B., Lukina E.A., Kisinovsky I., Dridi M.F., Elstein D., et al. Enzyme replacement therapy with velaglucеразе alpha in Gaucher disease: Results from a randomized, double-blind, multinational, Phase 3 study. *Am J Hematol* 2013; 88 (3): 166–71. DOI: 10.1002/ajh.23381
- Ben Turkia H., Gonzalez D.E., Barton N.W., Zimran A., Kabra M., Lukina E.A., et al. Velaglucеразе alpha enzyme replacement therapy compared with imiglucеразе in patients with Gaucher disease. *Am J Hematol* 2013; 88 (3): 179–84. DOI: 10.1002/ajh.23382
- Smith L., Rhead W., Charrow J., Shankar S.P., Bavdekar A., Longo N., et al. Long-term velaglucеразе alpha treatment in children with Gaucher disease type 1 naïve to enzyme replacement therapy or previously treated with imiglucеразе. *Mol Genet Metab* 2016; 117 (2): 164–71. DOI: 10.1016/j.ymgme.2015.05.012
- Saeki I., Tokunaga S., Matsuura T., Hayashida M., Yanagi Y., Taguchi T. A formula for determining the standard liver volume in children: a special reference for neonates and infants. *Pediatr Transplant* 2012; 16 (3): 244–9.
- Prassopoulos P., Daskalogiannaki M., Raissaki M., Hatjidakis A., Gourtsoyiannis N. Determination of normal splenic volume on computed tomography in relation to age, gender and body habitus. *Eur Radiol* 1997; 7 (2): 246–8.
- Детская ультразвуковая диагностика. В 5 томах. Под ред. М.И. Пыкова. Т. 5. М.: Видар; 2016. 360 с.
- Elstein D., Burrow T.A., Charrow J., Giraldo P., Mehta A., Pastores G.M., et al. Home infusion of intravenous velaglucеразе alpha: Experience from pooled clinical studies in 104 patients with type 1 Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 2017; 120 (1–2): 111–5. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.08.005
- Ida H., Tanaka A., Matsubayashi T., Murayama K., Hongo T., Lee H.M., Mellgard B. A multicenter, open-label extension study of velaglucеразе alpha in Japanese patients with Gaucher disease: Results after a cumulative treatment period of 24 months. *Blood Cells Mol Dis* 2016; 59: 140–7. DOI: 10.1016/j.bcmd.2015.10.002
- Zimran A., Elstein D., Gonzalez D.E., Lukina E.A., Qin Y., Dinh Q., Turkia H.B. Treatment-naïve Gaucher disease patients achieve therapeutic goals and normalization with velaglucеразе alpha by 4 years in phase 3 trials. *Blood Cells Mol Dis* 2018; 68: 153–9. DOI: 10.1016/j.bcmd.2016.10.007
- Hughes D.A., Gonzalez D.E., Lukina E.A., Mehta A., Kabra M., Elstein D., et al. Velaglucеразе alpha (VPRIV) enzyme replacement therapy in patients with Gaucher disease: Long-term data from phase III clinical trials. *Am J Hematol* 2015; 90 (7): 584–91. DOI: 10.1002/ajh.24012
- Pastores G.M., et al. Long-term velaglucеразе alpha of enzyme replacement therapy in children with type 1 Gaucher disease. Poster presented at the SSIEM Annual Symposium, September 2–5. Innsbruck, Austria, 2014.
- Giraldo P., et al. Safety and efficacy of velaglucеразе alpha in children with type 1 Gaucher disease: 2-year experience. Poster presented at the American College of Medical Genetics (ACMG) Annual Clinical Genetics Meeting, March 27–31. Charlotte, North Carolina, USA, 2012.
- Murugesan V., Chuang W.L., Liu J., Lischuk A., Kacena K., Lin H., et al. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am J Hematol* 2016; 91 (11): 1082–9. DOI: 10.1002/ajh.24491
- Hurvitz N., Dinur T., Becker-Cohen M., Cozma C., Hovakimyan M., Oppermann S., et al. Glucosylsphingosine (lyso-Gb1) as a Biomarker for Monitoring Treated and Untreated Children with Gaucher Disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (12): 3033. DOI: 10.3390/ijms20123033
- Elstein D., Mellgard B., Dinh Q., Lan L., Qiu Y., Cozma C., et al. Reductions in glucosylsphingosine (lyso-Gb1) in treatment-naïve and previously treated patients receiving velaglucеразе alpha for type 1 Gaucher disease: Data from phase 3 clinical trials. *Mol Genet Metab* 2017; 122 (1–2): 113–20. DOI: 10.1016/j.ymgme.2017.08.005
- Grabowski G.A., et al. Linear growth over 2 years of velaglucеразе alpha therapy in children with type 1 Gaucher disease previously treated with imiglucеразе. Poster presented at the American College of Medical Genetics (ACMG) Annual Clinical Genetics Meeting, March 27–31. Charlotte, North Carolina, USA, 2012.
- Pastores G.M., Rosenbloom B., Weinreb N., Goker-Alpan O., Grabowski G., Cohn G.M., Zahrieh D. A multicenter open-label treatment protocol (HGT-GCB-058) of velaglucеразе alpha enzyme replacement therapy in patients with Gaucher disease type 1: safety and tolerability. *Genet Med* 2014; 16 (5): 359–66. DOI: 10.1038/gim.2013.154
- Goker-Alpan O., et al. Safety of velaglucеразе alpha in type 1 Gaucher disease patients with anti-imiglucеразе antibodies. Poster presented at the American Society of Human Genetics (ASHG) 62nd Annual meeting, November 6–10. San Francisco, CA, USA, 2012.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 20.06.2023
Принята к печати 17.07.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-104-120

Эффективность применения TRK-ингибитора энтректиниба у пациентов с экстракраниальными *NTRK*-перестроенными опухолями

Т.В. Страдомская¹, А.М. Сулейманова², Д.М. Коновалов¹, А.Е. Друй¹, А.В. Панферова¹, Е.В. Преображенская³, Н.А. Андреева¹, Г.Б. Сагоян², М.В. Телешова¹, Л.А. Смирнова¹, О.С. Зацаринная¹, Т.В. Шаманская¹, Н.С. Грачев¹, М.В. Рубанская², К.И. Киргизов², Е.Н. Имянитов³, С.Р. Варфоломеева², Д.Ю. Качанов¹

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Контактная информация:

Страдомская Татьяна Валерьевна,
врач-детский онколог отделения
клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: stv-sergeeva@mail.ru

Соматические транслокации с вовлечением генов семейства *NTRK* встречаются в 0,34–2,2% случаев всех злокачественных новообразований (ЗНО) у детей. Продемонстрированная в проспективных клинических исследованиях эффективность TRK-ингибиторов расширяет возможности терапии пациентов с солидными ЗНО, характеризующимися наличием перестроек генов *NTRK*. Целью настоящего исследования явилось обобщение первого российского опыта применения TRK-ингибитора энтректиниба у пациентов с *NTRK*-перестроенными экстракраниальными солидными опухолями, включенных в программу расширенного доступа. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. В исследование включены 8 пациентов, получавших лечение в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Основными критериями включения в программу расширенного доступа были наличие подтвержденной перестройки генов *NTRK1/2/3* в солидной опухоли при отсутствии доказанной эффективной системной терапии у пациентов с нерезектабельными опухолями, прогрессирование/рецидив в процессе проведения терапии, назначенной в соответствии с установленным диагнозом, группой риска и другими критериями стратификации на группы риска, и невозможность проведения радикального хирургического лечения без калечащих и инвалидизирующих последствий. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 4,3 месяца (разброс 1,2–83,6 месяца). Соотношение мальчики:девочки – 1:1. Распределение по локализации первичной опухоли: голова и шея – 6 (75%) пациентов, грудная клетка – 1 (12,5%), малый таз – 1 (12,5%). Ни у одного пациента на момент постановки диагноза не было выявлено поражения регионарных лимфатических узлов и отдаленных метастатических очагов. Распределение по гистологическому типу (согласно гистологическому заключению): инфантильная фибросаркома – 4 (50%), недифференцированная круглоклеточная саркома низкой степени злокачественности – 1 (12,5%), недифференцированная веретенноклеточная саркома высокой степени злокачественности – 1 (12,5%), *NTRK*-перестроенная веретенноклеточная саркома низкой степени злокачественности – 1 (12,5%), веретенноклеточная опухоль, ассоциированная с перестройкой *NTRK*, – 1 (12,5%). Иммуногистохимическое исследование с использованием моноклонального антитела рап-TRK было выполнено 7/8 (87,5%) пациентам. В 4/7 (57%) случаях отмечена экспрессия TRK, в 3/7 (43%) – отсутствие экспрессии. Перестройки генов *NTRK1* и *NTRK3* были подтверждены у всех пациентов. Распределение по окончательному методу выявления транслокаций: полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией – 4 (50%), высокопроизводительное секвенирование РНК – 4 (50%). У 3/8 (37,5%) пациентов выявлена перестройка гена *NTRK1*, у 5/8 (62,5%) – *NTRK3*. Выявлены следующие химерные транскрипты: *ETV6::NTRK3* ($n = 4$), *DIP2C::NTRK3* ($n = 1$), *TPR::NTRK1* ($n = 1$), *TPM3::NTRK1* ($n = 1$), *MYH10::NTRK1* ($n = 1$). Один (12,5%) пациент получал энтректиниб в качестве терапии первой линии, остальные (7/8; 87,5%) – в качестве второй или последующих линий. Трём (37,5%) пациентам проведено хирургическое вмешательство перед терапией энтректинибом: 2/3 в объеме R2-резекции, 1/3 – R0/R1 (края резекции не оценивались). Лучевая терапия не проводилась ни в одном случае. Медиана длительности терапии энтректинибом на момент анализа составила 11,8 мес (разброс 2,3–20,1 мес). Отсроченная операция проведена 2/8 пациентам, по данным гистологического заключения отмечен патоморфоз IV степени. Нежелательные явления на терапии энтректинибом отмечены у 3/8 пациентов. Медиана времени до возникновения нежелательных явлений составила 0,23 мес (разброс 0,2–7,96 мес). У 3 пациентов потребовался перерыв в приеме препарата для купирования симптомов, у 2 больных была необходимость в редукции дозы на 1 ступень при возобновлении терапии. Медиана наблюдения с момента постановки диагноза составила 19,5 мес (разброс 14,9–75,0 мес). Все пациенты, включенные в анализ ($n = 8$), живы, из них 3 без визуализируемого опухолевого процесса. Таргетная терапия завершена у 4/8 (50%) пациентов, 4/8 (50%) продолжают лечение энтректинибом. Полный ответ достигнут в 3/8 случаях, очень хороший частичный ответ – в 2/8. По 1 случаю пришлось на частичный ответ, незначительный частичный ответ и стабилизацию. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности

и безопасности энтректиниба у пациентов с экстракраниальными солидными опухолями при наличии подтвержденных перестроек генов семейства *NTRK*. Необходимы дополнительные исследования для определения места TRK-ингибиторов в терапии различных видов солидных ЗНО у детей и оценке отдаленных результатов терапии.

Ключевые слова: дети, гены семейства *NTRK*, TRK-ингибиторы, таргетная терапия, энтректиниб

Страдомская Т.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 104–20. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-104-120

The efficacy of the TRK inhibitor entrectinib in patients with extracranial *NTRK* fusion-positive tumors

T.V. Stradomskaya¹, A.M. Suleymanova², D.M. Kononov¹, A.E. Druy¹, A.V. Panfyorova¹, E.V. Preobrazhenskaya³, N.A. Andreeva¹, G.B. Sagoyan³, M.V. Teleshova¹, L.A. Smirnova¹, O.S. Zaccarinnaya¹, T.V. Shamanskaya¹, N.S. Grachev¹, M.V. Rubanskaya², K.I. Kirgizov², E.N. Imyaninov³, S.R. Varfolomeeva², D.Yu. Kachanov¹

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

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg

Somatic translocations involving the *NTRK* genes occur in 0.34–2.2% of all malignant neoplasms in children. TRK inhibitors whose efficacy has been demonstrated in prospective clinical studies expand treatment options for patients with solid tumors harboring *NTRK* gene rearrangements. The aim of our study was to summarize the first Russian experience with the use of the TRK inhibitor entrectinib in patients with extracranial *NTRK* fusion-positive solid tumors included in the compassionate use program. This study was approved by the Independent Ethics Committee and the Academic Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The study included 8 patients who had been treated at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology and the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. The main criteria for inclusion in the compassionate use program were a confirmed rearrangement of either *NTRK1/2/3* genes in a solid tumor in patients with unresectable disease for whom no effective standard systemic therapy was available, progressive or recurrent disease during therapy prescribed according to the established diagnosis, risk group and risk stratification criteria, and the infeasibility of non-mutilating radical surgery. The median age at diagnosis was 4.3 months (range 1.2–83.6). The male to female ratio was 1:1. The primary site distribution was as follows: head and neck ($n = 6$; 75%), chest wall ($n = 1$; 12.5%), pelvis ($n = 1$; 12.5%). None of the patients had regional lymph node involvement or distant metastases at diagnosis. The distribution by histology (according to histopathology reports) was as follows: infantile fibrosarcoma ($n = 4$; 50%), undifferentiated round cell sarcoma, low-grade ($n = 1$; 12.5%), undifferentiated spindle cell sarcoma, high-grade ($n = 1$; 12.5%), *NTRK*-rearranged spindle cell sarcoma, low-grade ($n = 1$; 12.5%), spindle cell tumor associated with an *NTRK* rearrangement ($n = 1$; 12.5%). Immunohistochemistry (IHC) with a pan-Trk monoclonal antibody was performed in 7/8 (87.5%) patients. Pan-Trk IHC was positive in 4/7 (57%) patients. Rearrangements in the *NTRK1* and *NTRK3* genes were confirmed in all the patients. The final methods used for the detection of fusion transcripts were as follows: reverse transcription polymerase chain reaction ($n = 4$; 50%) and RNA-based next-generation sequencing ($n = 4$; 50%). *NTRK1* and *NTRK3* gene translocations were detected in 3/8 (37.5%) and 5/8 (62.5%) patients, respectively. The following fusion transcripts were identified: *ETV6::NTRK3* ($n = 4$), *DIP2C::NTRK3* ($n = 1$), *TPR::NTRK1* ($n = 1$), *TPM3::NTRK1* ($n = 1$), *MYH10::NTRK1* ($n = 1$). One (12.5%) patient received entrectinib as first-line therapy, other patients (7/8, 87.5%) received entrectinib as second- or subsequent-line therapy. Three (37.5%) patients had undergone surgery before treatment with entrectinib: 2 had R2 resection, 1 had R0/R1 resection (resection margins were not evaluated). None of the patients received radiation therapy. The median duration of entrectinib therapy at the time of analysis was 11.8 months (range 2.3–20.1). Delayed surgery was performed in 2/8 patients; according to the histopathology reports, they achieved grade IV pathomorphosis. Three patients experienced adverse events during treatment with entrectinib. The median time to adverse events was 0.23 months (range 0.2–7.96). Three patients required temporary interruption in treatment to relieve symptoms, a subsequent dose reduction by one dose level was necessary when resuming therapy in two patients. The median follow-up since diagnosis was 19.5 months (range 14.9–75.0). All the patients included in our analysis were alive, three of them had no radiologic evidence of disease. Fifty percent of the patients completed targeted therapy, another 50% of the patients continued treatment with entrectinib. Complete and very good partial response was achieved in 3/8 and 2/8 patients, respectively. Partial response, minor partial response and stable disease were observed in one patient each. These results indicate high efficacy and safety of entrectinib in pediatric patients with extracranial *NTRK* fusion-positive solid tumors. Further studies are needed to determine the therapeutic potential of TRK inhibitors in the treatment of different solid malignant neoplasms in children and to assess long-term treatment results.

Key words: pediatric, *NTRK* gene family, TRK inhibitors, targeted therapy, entrectinib

Stradomskaya T.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 104–20. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-104-120

Перестройки с участием генов семейства нейротрофной тропомиозин-рецепторной киназы (*NTRK1/2/3*) являются редкими онкогенными драйверными событиями, описанными при целом ряде солидных новообразований у детей и взрослых. По данным крупных международных исследований, частота выявления перестроек генов семейства *NTRK* в педиатрической популяции варьирует от 0,34 до 2,2% [1–3]. Белки TRK представляют собой семейство 3 трансмембранных рецепторных тирозинкиназ (TRKA, TRKB и TRKC), кодируемых генами *NTRK1*, *NTRK2* и *NTRK3* соответственно [4]. TRK играют важную роль в эмбриональном развитии и

функционировании центральной (ЦНС) и периферической нервной системы у детей и взрослых путем активации специфическими лигандами нейротрофинами [4]. В нормальных условиях экспрессия TRK определяется в клетках преимущественно нервной ткани и ряде других, тогда как в злокачественном новообразовании (ЗНО) происходит патологическая активация генов, которая может быть обеспечена путем активирующих мутаций, альтернативного сплайсинга или транслокаций с участием соответствующих генов [1, 5, 6]. Перестройки генов *NTRK* являются драйверным онкогенным событием, приводящим к неконтролируемой киназной активности с

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 20.06.2023

Accepted 17.07.2023

Correspondence:

Tatyana V. Stradomskaya, a pediatric oncologist at the Department of Clinical Oncology, the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samoy Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: stv-sergeeva@mail.ru

последующей активацией нижележащих сигнальных путей [6, 7].

В настоящее время разработаны и прошли успешные клинические исследования ряд TRK-ингибиторов, таких как ларотректиниб и энтректиниб, что позволяет использовать данные препараты в качестве персонализированной терапии у пациентов с подтвержденными перестройками генов *NTRK*. В рамках текущих рекомендаций TRK-ингибиторы рассматриваются в качестве терапевтических опций у пациентов с метастатическими и местно-распространенными формами заболевания при условии отсутствия ответа или прогрессировании на стандартной терапии, а также в ситуациях, когда резекция опухоли ассоциирована с тяжелыми косметическими и дисфункциональными исходами.

С декабря 2019 г. в Российской Федерации была открыта программа расширенного доступа селективного ROS1- и TRK-ингибитора энтректиниба для пациентов детского и подросткового возраста, а также взрослых больных. В данной статье приведен анализ эффективности и безопасности терапии энтректинибом у пациентов с *NTRK*-перестроенными экстракраниальными ЗНО, получавшими лечение в рамках программы расширенного доступа в 2 федеральных центрах. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В анализ включены пациенты с *NTRK*-перестроенными опухолями, включенные в программу расширенного доступа препарата энтректиниб и получавшие лечение в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева ($n = 6$) и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина ($n = 2$) за период 12.2019–08.2022 (33 мес).

Диагноз устанавливался на основании морфологического исследования ткани опухоли в патолого-анатомических лабораториях 2 федеральных центров, являющихся референс-лабораториями по педиатрическим новообразованиям. При проведении настоящего анализа использовался окончательный диагноз, указанный в гистологическом заключении. Во всех случаях были верифицированы различные варианты сарком мягких тканей. В качестве скрининга для выявления перестроек генов *NTRK* проводилось иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием моноклонального антитела рап-TRK. У пациентов с инфантильной фибросаркомой в качестве скрининга проводили оценку гена *ETV6* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Однако окончательным основанием для включения пациента

в программу расширенного доступа и назначения препарата энтректиниб было выявление экспрессии химерного транскрипта с участием последовательности протеинкиназного домена *NTRK1/2/3* с сохранением рамки считывания белка. Для этого были применены методы полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для выявления экспрессии химерного гена *ETV6::NTRK3* у пациентов с инфантильной фибросаркомой, а также секвенирование РНК у детей с другими типами опухоли.

На инициальном этапе все пациенты прошли полный объем обследований для верификации диагноза и установления стадии процесса в рамках классификации TNM и постоперационной клинической группы по IRS (Intergroup Rhabdomyosarcoma Study). Все пациенты стратифицировались согласно протоколу Немецкой группы по лечению сарком мягких тканей у детей CWS-guidance 2009. Дети с инфантильной фибросаркомой получали терапию по схеме VA (винкристин, актиномицин Д). Оценка ответа проводилась после 2-го или 3-го курса полихимиотерапии (ПХТ) с выполнением инструментального исследования (магнитно-резонансная (МРТ) или компьютерная (КТ) томография) волюметрическим методом.

Основными критериями включения в программу расширенного доступа являлись наличие подтвержденной перестройки одного из генов семейства *NTRK* в солидной опухоли при отсутствии доказанной эффективной системной терапии у пациентов с нерезектабельными опухолями, прогрессирование/рецидив в процессе проведения терапии, назначенной в соответствии с установленным диагнозом, группой риска и другими критериями стратификации на группы риска, и невозможность проведения радикального хирургического лечения без калечащих и инвалидизирующих последствий.

Все пациенты получали терапию ингибитором тирозинкиназ энтректинибом (Розлитрек, производитель Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария). Препарат был представлен следующими лекарственными формами для перорального приема: энтректиниб F1 (капсулы по 100 мг во флаконах №7 и капсулы по 200 мг во флаконах №30 (использовались до марта 2022 г., форма заменена на мини-таблетки)); энтректиниб F06 (капсулы по 100 и 200 мг во флаконах №30 (с августа 2021 г.); энтректиниб мини-таблетки в стик-пакетах по 50 мг, по 30 стик-пакетов в картонной коробке (с марта 2022 г.). Дозировка энтректиниба у детей рассчитывалась в зависимости от площади поверхности тела в соответствии с руководством по программе расширенного доступа. Расчетная доза имела зависимость от формы выпуска препарата и возраста пациента: для формы F1 – 550 мг/м², для форм

F06 и мини-таблеток – 300 мг/м²; для пациентов 1–6 месяцев – 250 мг/м², с рождения до 1 месяца – 100 мг/м². Дети, способные проглотить капсулы, принимали энтректиниб в капсулах по 100 и 200 мг. Дети, неспособные проглотить капсулы целиком, но принимающие твердую пищу, получали энтректиниб F1 или мини-таблетки, смешанные с мягкой пищей. Пациенты, которым требовалось назогастральное/гастральное или пероральное введение суспензии с помощью шприца, получали энтректиниб в виде водной суспензии, приготовленной из капсул по 100 или 200 мг в соответствии с Руководством по программе расширенного доступа. Прием препарата был непрерывным в течение 28 дней с последующим повторением курса.

Начало терапии энтректинибом осуществлялось в условиях федерального центра для отслеживания побочных эффектов, в случае удовлетворительной переносимости пациент продолжал терапию в амбулаторных условиях по месту жительства.

Ответ на терапию энтректинибом оценивался на 4-й и 8-й неделе приема препарата с использованием волюметрической оценки по результатам КТ или МРТ. Выделялись следующие варианты ответа: полный ответ (ПО) – полное исчезновение всех видимых признаков опухоли; очень хороший частичный ответ (ОХЧО) – уменьшение объема > 90%; частичный ответ (ЧО) – уменьшение объема > 66%, незначительный ЧО (НЧО) – уменьшение объема < 66%, но > 33%; стабилизация заболевания (СЗ) – уменьшение объема < 33%; прогрессирование – увеличение объема > 33% или появление новых очагов. Далее в случае положительного эффекта контрольные обследования проводились каждые 12 нед. Результаты контрольных обследований обсуждались на междисциплинарных совещаниях для решения вопроса о возможности проведения second-look-операции. Длительность терапии определялась индивидуально лечащим врачом пациента. В рамках программы расширенного доступа была предусмотрена возможность проведения терапии до констатации прогрессирования заболевания или непереносимой токсичности.

Контроль токсичности проводился с помощью физического осмотра, лабораторных анализов и мониторинга нежелательных явлений. В объем обследований включались лабораторные исследования с оценкой общего анализа крови, общего анализа мочи, биохимических показателей крови, функционального исследования с оценкой работы сердечно-сосудистой системы (электрокардиограмма). Оценка токсичности терапии проводилась по критериям NCI CTC V5.0 (National Cancer Institute Common Toxicity Criteria).

Информация о нежелательных побочных явлениях передавалась в отдел фармаконадзора компа-

нии-производителя (компания АО «Рош-Москва»). Сбор информации о нежелательных явлениях и реакциях, а также возникновении особых ситуаций, жалобах на качество препарата выполнялся рутинно в рамках программы расширенного доступа. В течение 1 рабочего дня после получения данных от родителя лечащий врач отправлял в компанию АО «Рош-Москва» информацию о серьезном нежелательном явлении, в течение 30 календарных дней – о несерьезных нежелательных явлениях и особых ситуациях. Осуществлялся сбор данных о последующем наблюдении по каждому отдельному случаю нежелательного явления, включавший 2 запроса дополнительной информации. Ежеквартально составлялись и сверялись перечни сообщений по безопасности, которые были получены за предыдущий период.

Для целей настоящего исследования проведен ретроспективный сбор данных из 2 центров, в которых пациенты получали лечение. Информация регистрировалась в специально разработанной исследовательской базе данных в программе Microsoft Excel на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Законные представители пациентов подписывали добровольное информированное согласие на применение незарегистрированного лекарственного препарата, предоставляемого в рамках программы расширенного доступа, и на использование информации в научных исследованиях и публикациях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящий анализ включены 8 пациентов с экстракраниальными *NTRK*-перестроенными опухолями. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 4,3 месяца (разброс 1,2–83,6 месяца). У 7/8 (87,5%) пациентов опухоль выявлена на первом году жизни. Соотношение мальчики:девочки составило 1:1. Полная характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в *таблице 1*. Локализация опухолевого процесса включала следующие анатомические области: голова и шея ($n = 6$; 75%) (*рисунок 1*), грудная клетка ($n = 1$; 12,5%), малый таз ($n = 1$; 12,5%). У 7/8 (87,5%) пациентов опухоль распространялась за пределы органа, из которого она исходила. Медиана объема первичной опухоли составила 65,35 см³ (разброс 7,41–135,4 см³). Ни у одного пациента не было отмечено поражения регионарных лимфатических узлов и отдаленных метастатических очагов на момент постановки диагноза.

Распределение по гистологическому типу согласно патоморфологическим заключениям было следующим: инфантильная фибросаркома ($n = 4$; 50%), недифференцированная круглоклеточная саркома низкой степени злокачественности

Рисунок 1

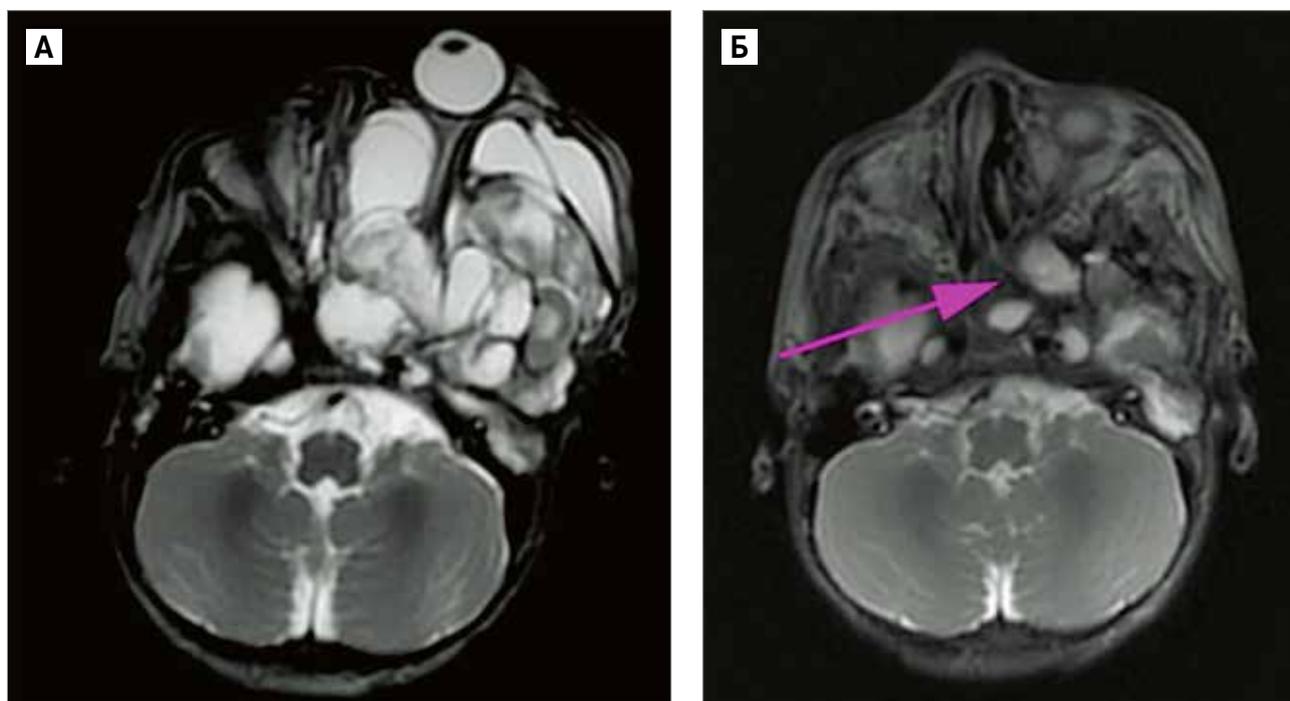
Визуализация пациента с инфантильной фибросаркомой параменингеальной локализации. МРТ головы с внутривенным контрастированием, T2-взвешенные изображения

А – первичная визуализация. Слева определяется многокамерное образование с распространением в левую верхнечелюстную пазуху, ячейки лабиринта решетчатой кости, пазухи клиновидной кости, левую орбиту, размерами до $6,7 \times 6,5 \times 6,9$ см, объем 156 см^3 . Образование циркулярно охватывает зрительный нерв и смещает глазное яблоко кпереди за пределы орбиты, стенозирует носовые ходы и носоглотку. В передней и средней черепных ямках слева через крыло клиновидной кости и лобную кость опухоль экспансивно пролабирует в полость черепа, сдавливает левые лобную и височную доли; Б – через 2 мес от начала терапии энтректинибом. Кистозно-солидное образование с распространением в левую верхнечелюстную пазуху, ячейки лабиринта решетчатой кости, пазуху клиновидной кости, на левую крылонебную ямку и левую орбиту, со слабовыраженным накоплением контрастного препарата солидной частью опухоли, размерами до $4,9 \times 4,7 \times 1,8$ см, объем $21,5 \text{ см}^3$. Сохраняется экзофтальм слева, деформация и сдавление левого зрительного нерва. Явного интракраниального распространения нет. Просвет носо- и ротоглотки не деформирован

Figure 1

MRI imaging of a patient with infantile fibrosarcoma of parameningeal location. T2-weighted MRI of the head with intravenous contrast

A – initial imaging. On the left, there is a multilocular mass, up to $6.7 \times 6.5 \times 6.9$ cm in size ($V = 156 \text{ cm}^3$), which extends into the left maxillary sinus, the ethmoidal cells, the sphenoid sinuses, and the left orbit. The mass encircles the optic nerve and displaces the eye globe anteriorly out of the orbit; it causes stenosis of the nasal passages and the nasopharynx. In the anterior cranial fossa and middle cranial fossa on the left, the tumor protrudes into the cranial cavity through the wing of the sphenoid bone and the frontal lobe and compresses the left frontal and temporal lobes. Б – imaging performed 2 months after the initiation of entrectinib treatment. The image shows the cystic and solid mass, up to $4.9 \times 4.7 \times 1.8$ cm in size ($V = 21.5 \text{ cm}^3$), extending into the left maxillary sinus, the ethmoidal cells, the sphenoid sinus, the left pterygopalatine fossa, and the left orbit, with poor contrast uptake in the solid tumor component. The exophthalmos as well as the deformation and compression of the optic nerve on the left are still present. The nasopharyngeal and oropharyngeal lumens are not deformed



($n = 1$; 12,5%), недифференцированная веретеноклеточная саркома высокой степени злокачественности ($n = 1$; 12,5%), *NTRK*-перестроенная веретеноклеточная саркома низкой степени злокачественности ($n = 1$; 12,5%), веретеноклеточная опухоль, ассоциированная с перестройкой гена *NTRK* ($n = 1$; 12,5%) (рисунок 2). ИГХ-исследование с использованием моноклонального антитела рап-TRK было выполнено 7/8 (87,5%) пациентам: у 4/7 (57%) отмечена экспрессия рап-TRK, у 3/7 (43%) экспрессия не выявлена. У 3 детей отмечена ядерная экспрессия рап-TRK, характерная для перестроек гена *NTRK3*, что в последующем было подтверждено другими методами. В 1 случае выявлена тотальная цитоплазматическая экспрессия рап-TRK, типичная для транслокации гена *NTRK1* (рисунок 3).

Перестройки с участием генов *NTRK* были выявлены у всех детей. Распределение пациентов по методу выявления экспрессии химерного транскрипта: ОТ-ПЦР ($n = 4$; 50%), высокопроизводительное секвенирование РНК ($n = 4$; 50%). У 3/8 (37,5%) детей выявлена перестройка гена *NTRK1*, у 5/8 (62,5%) – *NTRK3*. Гены-партнеры, участвующие в образовании химерных конструкций с генами *NTRK1* и *NTRK3* указаны в таблице 2.

У всех пациентов на момент постановки диагноза установлена III стадия заболевания согласно постоперационной классификации IRS за счет наличия макроскопической остаточной опухоли. В 1 случае энтректиниб назначен в первой линии терапии, учитывая отсутствие терапевтических альтернатив у ребенка с нерезектабельной недифференцированной круглоклеточной саркомой низкой степени злокач-

Таблица 1
Характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 1
Characteristics of patients included in the study

Пациент Patient	Пол Sex	Возраст, месяцы Age, months	Гистология Histology	Локализация Site	Транслокация гена Gene translocation	Метод выявления Identification technique	TNM	IRS	Схема стандартной терапии, ответ на Standard treatment regimen, response to this treatment	Ответ на момент инициации терапии энтректинибом Response to previous treatment at the initiation of treatment with entrectinib	Линия терапии энтректинибом Line of treatment with entrectinib	Лекарственная форма на момент начала терапии Formulation, dose at the beginning of treatment	Хирургическое лечение рапии энтректинибом Surgery during treatment with entrectinib	Длительность терапии энтректинибом, мес Duration of treatment, months	Статус терапии энтректинибом Status of treatment with entrectinib	Ответ на терапию энтректинибом Response to treatment with entrectinib
№1	Женский Female	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
№1	Женский Female	1.2	Недифференцированная круглоклеточная саркома низкой степени злокачественности Low-grade undifferentiated round cell sarcoma	Носоглотка Nasopharynx	<i>NTRK1</i>	NGS	T2aNDM0	III	Не проводилась Not performed	Не проводилась No previous treatment	Первая линия First line	Капсулы (форма для назогастрального зонда) Capsules (for administration via nasogastric tubes)	Не проводилось Not performed	11,9	Продолжается Continued	ЧО PR
№2	Женский Female	4.7	Инфантильная фибросаркома Infantile fibrosarcoma	Параменнгеальная локализация Parameningeal	<i>NTRK3</i>	OT-ПЦР RT-PCR	T2bNDM0	III	I2VA №2	C3 SD	Вторая линия Second line	Капсулы (форма для гастростомы) Capsules (for administration via gastrostomy tubes)	Не проводилось Not performed	14,8	Продолжается Continued	OXЧ0 VGPR
№3	Мужской Male	3.9	Инфантильная фибросаркома Infantile fibrosarcoma	Параменнгеальная локализация Parameningeal	<i>NTRK3</i>	OT-ПЦР RT-PCR	T2bNDM0	III	VA №4	ЧО PR	Вторая линия Second line	Капсулы Capsules	Биопсия (пато-морфоз IV степени) Biopsy (grade IV pathomorphosis)	11,7	Завершена Completed	C3 SD
№4	Женский Female	11.0	Недифференцированная веретеноклеточная саркома высокой степени злокачественности High-grade undifferentiated spindle cell sarcoma	Параменнгеальная локализация Parameningeal	<i>NTRK3</i>	NGS	T2bNDM0	III	I2VA/I2VAd №8	ЧО PR	Вторая линия Second line	Капсулы Capsules	Не проводилось Not performed	14,9	Продолжается Continued	OXЧ0 VGPR
№5	Мужской Male	2.6	Инфантильная фибросаркома Infantile fibrosarcoma	Грудная клетка Chest	<i>NTRK3</i>	OT-ПЦР RT-PCR	T2bNDM0	III	VAC №2	ЧО PR	Вторая линия Second line	Капсулы Capsules	R1 (пато-морфоз IV степени) R1 (grade IV pathomorphosis)	2,3	Завершена Completed	ПО CR

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
№6	Женский Female	4,8	<i>NTRK</i> -перестроенная веретеноклеточная саркома низкой степени злокачественности Low-grade spindle cell sarcoma with an <i>NTRK</i> rearrangement	Шей, интра-спинальное распространение Neck, intraspinal extension	<i>NTRK1</i>	NGS	T2bN0M0	III	R2 + I2VA/I2VAd №2 + бин/циклофосфамид 9,5 мес + ДН 3 года R2 + I2VA/I2VAd №2 + MT (vinorelbine/cyclophosphamide for 9.5 months) + FU for 5 years	C3 SD	Третья линия Third line	Капсулы Capsules	Не проводилось Not performed	10,1	Продолжает Continued	НЧО mPR
№7	Мужской Male	83,6	Веретеноклеточная опухоль, ассоциированная с перестройкой <i>NTRK</i> низкой степени злокачественности Low-grade spindle cell tumor associated with an <i>NTRK</i> rearrangement	Основание полового члена Base of the penis	<i>NTRK1</i>	NGS	T2N0M0	III	R2 №3 + иматиниб + метотрексат/винбластин R2 №3 + imatinib + methotrexate/vinblastine	C3 SD	Третья линия Third line	Капсулы Capsules	Не проводилось Not performed	20,1	Завершена Completed	ПО CR
№8	Мужской Male	2,6	Инфантильная фибросаркома Infantile fibrosarcoma	Орбита Orbit	<i>NTRK3</i>	ОТ-ПЦР RT-PCR	T1N0M0	III	AV №1 + циклофосфамид/карбоплатин операция (R0/R1) AV №1 + cyclophosphamide/carboplatin №4 + surgery (R0/R1)	ОХЧО VGPR	Третья линия Third line	Капсулы Capsules	Не проводилось Not performed	8,0	Завершена Completed	ПО CR

Примечание. МТ – метрoномная терапия; ДН – динамическое наблюдение.

Notes. MT – metronomic therapy; RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction; FU – follow-up; SD – stable disease; mPR – minor partial response; PR – partial response; VGPR – very good partial response; CR – complete response.

Рисунок 2

Микроскопическая картина веретеноклеточной опухоли низкой степени злокачественности, ассоциированной с перестройкой *NTRK* (окраска гематоксилином и эозином, × 200)

Неопластическая ткань гиперклеточная, состоит из относительно мономорфных клеток веретеновидной формы с небольшим количеством эозинофильной цитоплазмы с вытянутыми сигаровидными мономорфными ядрами без признаков анаплазии. Митотическая активность не отмечается

Figure 2

Microscopic appearance of a low-grade spindle cell tumor associated with an *NTRK* rearrangement (hematoxylin and eosin staining, × 200)

The neoplastic tissue is hypercellular, consists of relatively monomorphic spindle-shaped cells with scant eosinophilic cytoplasm and elongated cigar-shaped monomorphic nuclei without signs of anaplasia. Mitotic activity is not observed

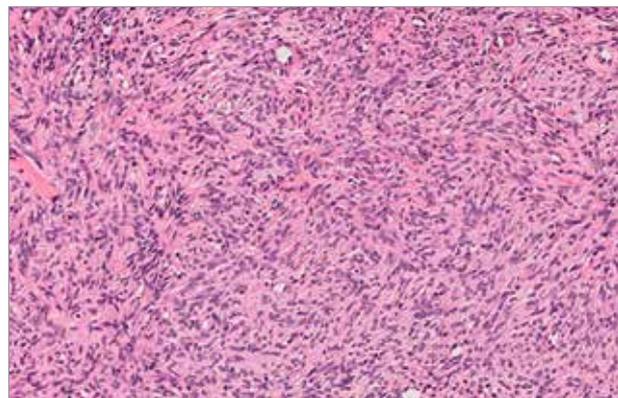
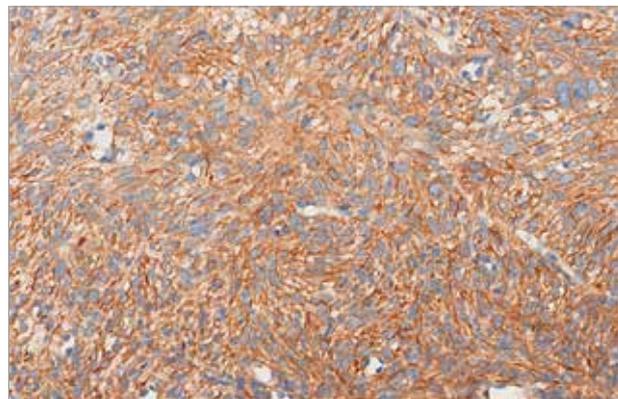


Рисунок 3

ИГХ-картина тотальной экспрессии pan-TRK (цитоплазматический локус, × 400)

Figure 3

Immunohistochemical pattern of the total expression of pan-TRK (a cytoplasmic locus, × 400)



ственности. Семь (87,5%) пациентов получили предшествующую химиотерапию перед началом приема энтректиниба. У 3 из 8 детей в процессе терапии первой линии проведено хирургическое вмешательство: в 2/3 случаях в объеме R2-резекции, в 1/3 – R0/R1 (края резекции не оценивались). Лучевая терапия не проводилась ни в одном случае. Семерым (87,5%) пациентам проводилась оценка ответа на предшествующее лечение на момент инициации терапии энтректинибом: в 3 (43%) случаях отмечена С3, в 3 (57%) – ЧО, у 1 пациента после R0/R1 – ОХЧО. В 1 случае инициирована терапия энтректинибом

Таблица 2

Варианты химерных генов у пациентов с *NTRK*-перестроенными экстракраниальными ЗНО

Table 2

Types of fusion genes in the patients with *NTRK*-rearranged malignant neoplasms of extracranial location

Ген Gene	<i>NTRK1</i> (n = 3)	<i>NTRK2</i> (n = 0)	<i>NTRK3</i> (n = 5)
<i>TPR</i>	1	–	–
<i>ETV6</i>	–	–	4
<i>DIP2C</i>	–	–	1
<i>MYH10</i>	1	–	–
<i>TPM3</i>	1	–	–

после хирургического вмешательства в объеме R0/R1 (края резекции не оценивались), учитывая предшествующее неблагоприятное течение заболевания, в других случаях – при наличии макроскопически остаточной опухоли, что позволило оценить объективный ответ на лечение. Схема и объем инициальной терапии указаны в таблице 1. Медиана времени от момента постановки диагноза до начала терапии энтректинибом составила 4,9 мес (разброс 1,6–64,9 мес).

Медиана длительности терапии энтректинибом на момент написания статьи составила 11,8 мес (разброс 2,3–20,1 мес). Промежуточный ответ на терапию энтректинибом оценивался у 7/8 пациентов, из них у 5 отмечен НЧО, у 1 – ЧО, у 1 – СЗ. Отсроченная операция проведена 2 пациентам. В 1 случае ребенку с параменингеальной локализацией инфантильной фибросаркомы выполнена биопсия образования, в другом случае пациенту с локализацией инфантильной фибросаркомы в мягких тканях грудной стенки выполнена R1-резекция (рисунок 4). По данным гистологического заключения у этого пациента отмечен патоморфоз IV степени, что позволило завершить терапию. На момент написания статьи оценка ответа проведена всем пациентам. НЧО отмечен у 1/8 пациентов, СЗ – у 1/8, ЧО – у 1/8, ОХЧО – у 2/8, ПО – у 3/8. Случаев прогрессирования заболевания не выявлено.

Нежелательные явления были отмечены у 3/8 пациентов, всего сообщено в отдел фармаконадзора компании-производителя АО «Рош-Москва» о 16 нежелательных явлениях. Большинство из них были I–II степени и контролируемые, самыми частыми – тошнота и рвота ($n = 2$) (таблица 3). Также зарегистрированы следующие нежелательные явления (по 1 сообщению на каждое): боль в животе в околопупочной и эпигастральной областях, повышение температуры тела в ночное время, инфекция мочевыводящих путей и лейкоцитурия, сухой кашель, синусовая аритмия. Изменения лабораторных показателей включали (по 1 сообщению на каждое): повышение уровня креатинина в сыворотке крови в 1,5 раза, нейтропению II степени, гематологическую токсич-

ность II степени, гиперкалиемию. У 1 пациента зарегистрирована головная боль после отмены препарата в связи с завершением лечения. Одно явление классифицировано как серьезное/медицински значимое – инфекция мочевыводящих путей. Зарегистрировано 1 явление IV степени тяжести – многократная рвота. Медиана времени до возникновения нежелательных явлений составила 0,23 мес (разброс 0,2–7,96 мес). Двум пациентам потребовалось снижение дозировки из-за нежелательного явления: в первом случае из-за рвоты, во втором – ввиду повышения температуры тела в ночное время. Коррекция дозы препарата проводилась в соответствии с рекомендациями руководства по программе расширенного доступа. В первом случае на фоне редуциции дозы нежелательное явление было купировано. Во втором случае эпизоды лихорадки сохранялись на фоне снижения дозы энтректиниба, однако, учитывая хорошую переносимость препарата, терапия была продолжена в редуцированной дозе. В дополнительной редуциции дозы или отмене терапии из-за развития нежелательных явлений пациенты не нуждались. В целом энтректиниб переносился удовлетворительно и имел благоприятный профиль безопасности. Ограничением данной работы относительно сбора информации по безопасности является тот факт, что не все нежелательные явления могли быть репортированы своевременно ввиду амбулаторного лечения у части пациентов.

Исход наблюдения – все пациенты живы, из них 3/8 без признаков заболевания. Таргетная терапия завершена у 4/8 (50%) пациентов, 4/8 (50%) продолжают лечение энтректинибом. Медиана времени наблюдения с момента постановки диагноза составила 19,5 мес (разброс 14,9–75,0 мес).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетические aberrации с вовлечением генов семейства *NTRK* встречаются в 0,34–2,2% случаев всех солидных ЗНО, при этом опухоли с перестройками указанных генов не имеют общих характерных клинических или гистологических особенностей [1–3]. Перестройки генов *NTRK* впервые были обнаружены при карциноме толстой кишки в 1982 г. [8], а химерный ген *ETV6::NTRK3* был описан при инфантильной фибросаркоме еще в 1998 г. [9]. В последние годы благодаря широкому использованию технологии высокопроизводительного секвенирования спектр опухолей с перестройками генов *NTRK1/2/3* постепенно расширялся.

Показано, что частота встречаемости перестроек генов *NTRK* среди опухолей различной локализации и гистогенеза значительно отличается. В настоящее время принято выделять 2 основные категории

Рисунок 4

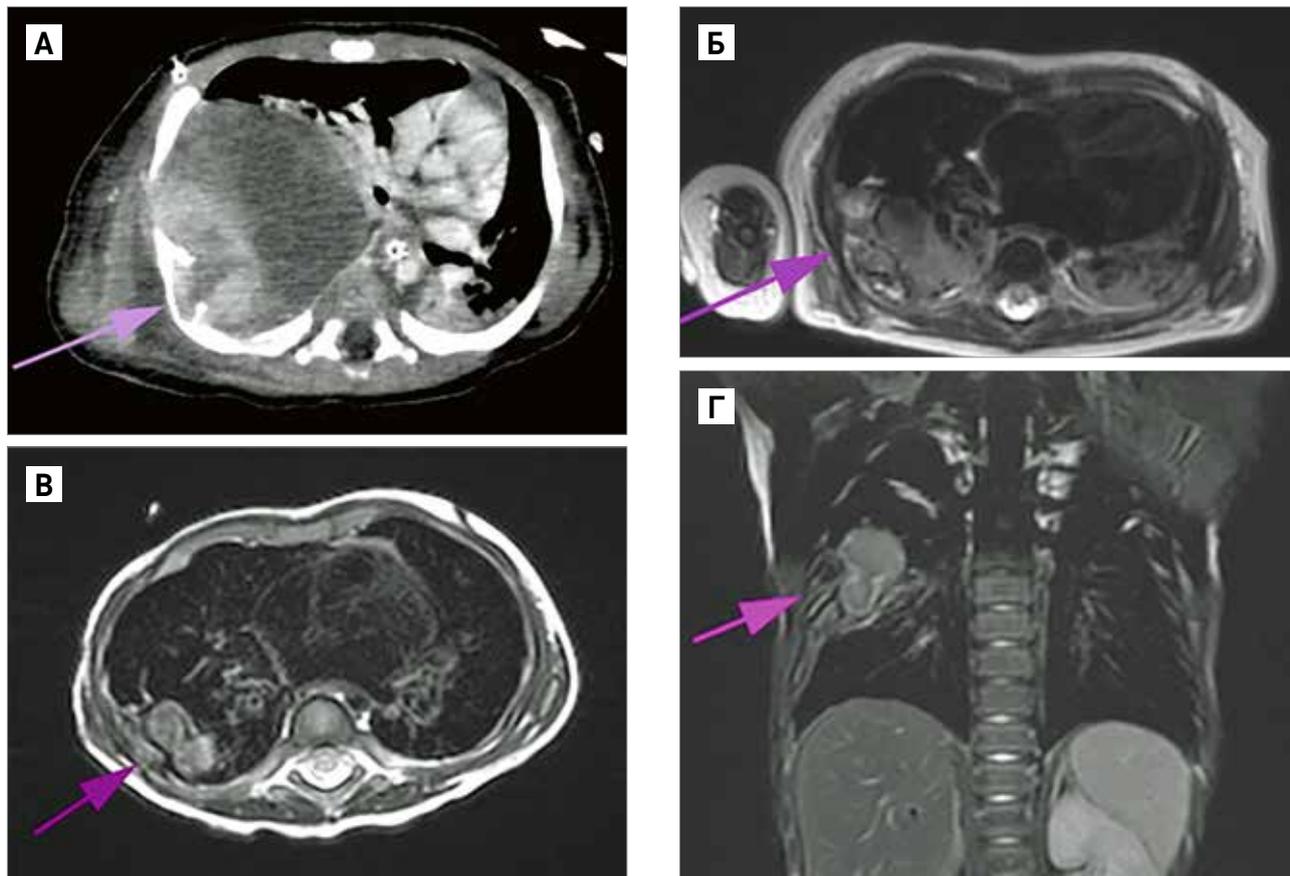
Визуализация пациента с локализацией опухоли в грудной клетке

А – первичная визуализация. Инициальная КТ с внутривенным контрастированием, артериальная фаза. Стрелкой указано опухолевое образование в правом гемитораксе с деструкцией 6-го ребра, размерами 6,2 × 6,0 × 7,0 см (объем 135 см³); Б – после 2 курсов ПХТ перед началом терапии энтректинибом. МРТ мягких тканей с внутривенным контрастированием, T2-взвешенное изображение. Стрелкой указано образование кистозно-солидной структуры с геморрагическими компонентами в кистах, размерами 6,5 × 4,2 × 2,9 см (объем 41,2 см³); В, Г – после 2 мес терапии энтректинибом. МРТ мягких тканей с внутривенным контрастированием, T2-взвешенное изображение. Стрелкой указано образование кистозно-солидной структуры с невыраженными геморрагическими компонентами в кистах, размерами 4,0 × 3,2 × 2,0 см (объем 13,3 см³)

Figure 4

Imaging of a patient with a tumor in the chest

A – initial imaging. Initial computed tomography with intravenous contrast in the arterial phase. The arrow shows a tumor, up to 6.2 × 6.0 × 7.0 cm in size (V = 135 cm³), in the right hemithorax with destruction of the 6th rib; Б – imaging performed after 2 courses of chemotherapy, before the initiation of treatment with entrectinib. Soft tissue MRI with intravenous contrast, T2-weighted image. The arrow shows the cystic and solid mass measuring 6.5 × 4.2 × 2.9 cm (V = 41.2 cm³) with hemorrhagic components in the cysts; В, Г – imaging performed after 2 months of entrectinib treatment. Soft tissue MRI with intravenous contrast, T2-weighted images. The arrows show the cystic and solid mass measuring 4.0 × 3.2 × 2.0 cm (V = 13.3 cm³) with small hemorrhagic components in the cysts



опухолей на основе частоты выявления перестроек генов *NTRK*. В первую категорию входят редкие опухоли с перестройками *NTRK*, выявляемыми более чем в 90% случаев, такие как инфантильная фибросаркома, секреторная карцинома молочной железы, клеточный тип врожденной мезобластной нефромы. Вторая категория представляет собой более распространенные опухоли с низкой частотой выявления перестроек *NTRK* (менее 5%), такие как рак легкого, колоректальный рак, меланома и рак щитовидной железы [5, 10, 11]. Классификация опухолей мягких тканей и костей Всемирной организации здравоохранения 5-го пересмотра, опубликованная в 2020 г., выделяет 2 группы новообразований мягких тканей, для которых характерны aberrации генов семейства *NTRK*: уже упомянутую выше инфантильную фибросаркому и группу веретенноклеточных опухолей [12].

Последняя группа выделена на основании выявления специфического молекулярного маркера и охватывает широкий спектр морфологически гетерогенных опухолей различной степени злокачественности, демонстрирующих частую коэкспрессию S100 и CD34 [12].

К настоящему времени идентифицировано более 80 различных генов-партнеров, участвующих в перестройках с генами *NTRK*, и эта информация продолжает непрерывно дополняться [2]. Наиболее часто происходят перестройки генов *NTRK1* и *NTRK3*, при этом для гена *NTRK1* характерна наибольшая вариабельность генов-партнеров [4, 10, 13]. Согласно опубликованным данным исследования, в котором проанализированы более 295 тыс. пациентов с онкологическими заболеваниями, включенными в базу данных FoundationCORE, опухоли с нали-

Таблица 3
Нежелательные явления, зарегистрированные на фоне терапии энтректинибом

Table 3
Adverse events that occurred during treatment with entrectinib

Нежелательное явление Adverse event	Любая степень тяжести, количество сообщений Any grade (severity), number of reported events	III–IV степень тяжести, количество сообщений Grade 3 or 4, number of reported events
Тошнота Nausea	2	0
Рвота Vomiting	2	1
Боль в животе в околопупочной области Periumbilical pain	1	0
Боль в животе в эпигастриальной области Epigastric pain	1	0
Головная боль Headache	1	0
Инфекция мочевыводящих путей Urinary tract infection	1	0
Повышение температуры тела в ночное время High temperature at night	1	0
Сухой кашель Dry cough	1	0
Синусовая аритмия Sinus arrhythmia	1	0
Повышение уровня креатинина Increased creatinine	1	0
Нейтропения Neutropenia	1	0
Гематологическая токсичность Hematologic toxicity	1	0
Гиперкалиемия Hyperkalemia	1	0
Лейкоцитурия Leukocyturia	1	0

чием перестройки одного из генов семейства *NTRK* были обнаружены у 889 пациентов, что составляет 0,3% случаев среди 45 различных типов опухолей, включенных в исследование. Также отмечено, что распространенность перестроек генов *NTRK* сильно различалась в зависимости от возраста и гистологического типа опухоли. Частота выявления перестроек составляла 0,28% и 1,34% среди пациентов в возрасте ≥ 18 и < 18 лет соответственно и была самой высокой у детей в возрастной группе < 5 лет (2,28%) [2].

Полученные нами результаты соответствуют данным, опубликованным в мировой литературе. Медиана возраста пациентов в нашей когорте составила 4,3 месяца, при этом у подавляющего большинства больных диагноз был установлен в течение первого года жизни. Все случаи были представлены опухолями мягких тканей, при этом была отмечена одинаковая представленность случаев инфантильной фибросаркомы и опухолей с перестройкой *NTRK*. Выявленные химерные конструкции включали типичный для инфантильной фибросаркомы

ген *ETV6::NTRK3*, ранее описанные при различных онкологических заболеваниях гены *TPR::NTRK1*, *MYH10::NTRK1* и *TPM3::NTRK1*, а также выявленный впервые ген *DIP2C::NTRK3*.

Относительная редкость перестроек генов *NTRK* и возможность их выявления при различных типах опухолей затрудняют обнаружение этих генетических aberrаций. Данный факт демонстрирует необходимость использования в клинической практике алгоритмов диагностики перестроек генов семейства *NTRK*. Существуют несколько доступных подходов и алгоритмов диагностики опухолей, перестройки генов *NTRK* в которых ожидаемы [14, 15]. Методы, используемые для обнаружения соответствующих перестроек и, следовательно, выявления потенциальных кандидатов для молекулярно-направленной терапии TRK-ингибиторами, включают ИГХ-исследование с использованием моноклонального антитела рап-TRK, FISH, ОТ-ПЦР и методы высокопроизводительного секвенирования ДНК и РНК. Так, алгоритм диагностики, разработанный экспертами Европейского общества медицинской онкологии (European Society of Medical Oncology, ESMO), предполагает использование методов FISH, ОТ-ПЦР или секвенирования нового поколения при новообразованиях с высокой частотой выявления перестроек *NTRK*, тогда как при тестировании неселективной популяции больных с неизвестной частотой встречаемости перестроек *NTRK1/2/3* оправдано использование ИГХ-исследования в качестве скрининга с последующим проведением дополнительного исследования только опухолей, экспрессирующих рап-TRK, или применение высокопроизводительного секвенирования в первой линии диагностического поиска. При этом технологии, использующие РНК в качестве анализа, являются предпочтительными, поскольку позволяют подтвердить сохранение рамки считывания белка в химерном транскрипте и оценить уровень его экспрессии в клетке [14]. Указанный алгоритм в частности используется для выявления опухолей с перестройками *NTRK* в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева [16]. Таким образом, можно сказать, что ИГХ-исследование с использованием рап-TRK может рассматриваться как метод скрининга для выявления *NTRK*-перестроенных опухолей. При этом необходимо отметить, что экспрессия рап-TRK может выявляться при ЗНО без доказанных перестроек генов *NTRK* (ложноположительные реакции) [17], и, напротив, экспрессия может отсутствовать, несмотря на наличие доказанных транслокаций генов *NTRK*, чаще гена *NTRK3* (ложноотрицательные результаты) [18]. Кроме того, для ряда опухолей характерна конституциональная экспрессия неперестроенного TRK, в частности для нейробластомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли и др., что может затруднять

интерпретацию результатов ИГХ-исследования [19]. Стоит отметить, что в нашей работе ИГХ-исследование с рап-TRK использовалось у большинства пациентов в процессе верификации диагноза, однако ряд новообразований не экспрессировали TRK, что, в свою очередь, демонстрирует необходимость обязательного использования молекулярно-генетических методов для идентификации опухолей с наличием перестроек генов *NTRK*. Как уже отмечалось выше, назначение TRK-ингибиторов целесообразно и оправдано только при доказанных перестройках генов *NTRK1/2/3*. В настоящее время изучаются новые методы выявления перестроек *NTRK* с использованием жидкостной биопсии и технологии NanoString, которые, вероятно, будут внедрены в клиническую практику в ближайшие годы, однако чувствительность такого подхода пока неизвестна и нуждается в определении [20, 21].

Использование молекулярного профилирования опухолей в сочетании с молекулярно-направленной терапией, соответствующей выявленным генетическим изменениям, улучшило результаты лечения пациентов с онкологическими заболеваниями [22]. Этому способствовали новые дизайны клинических испытаний, таких как «корзинные» (basket trials) и «зонтичные» (umbrella trials) исследования, созданные для изучения возможностей персонализированной терапии. Молекулярное профилирование опухолей становится все более широко используемым, задавая тенденции в терапии онкологических заболеваний, заключающиеся в лечении, не зависящем от гистологического типа опухоли и ее локализации, и основанные только на молекулярно-генетическом профиле [23]. Внедрение в клиническую практику TRK-ингибиторов (ларотректиниб и энтректиниб) – прямой пример такого подхода в терапии, поскольку оба препарата получили одобрение регулирующих органов после того, как в клинических исследованиях показали быстрый и стойкий ответ у пациентов с местно-распространенными и метастатическими формами новообразований различного гистогенеза и различной локализации с наличием перестроек генов семейства *NTRK* [24].

Ларотректиниб является первым селективным ингибитором рецепторных тирозинкиназ TRKA/B/C, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA). Эффективность и безопасность ларотректиниба оценивались в 3 клинических исследованиях у пациентов с перестройками генов *NTRK*: исследование фазы I у взрослых (LOXO-TRK-14001), исследование фазы I/II у детей (SCOUT), «корзинное» исследование фазы II у подростков и взрослых (NAVIGATE) [25]. Результаты эффективности клинических исследо-

ваний (LOXO-TRK-14001, SCOUT и NAVIGATE) были представлены в объединенном анализе D.S. Hong и соавт. в 2020 г. и включили 159 пациентов. Критериями включения являлись пациенты в возрасте 1 месяца и старше с нерезектабельными или метастатическими экстракраниальными солидными опухолями с выявленной перестройкой *NTRK*, которые ранее получали стандартную терапию. В целом общая частота объективного ответа составила 79%, при этом в 16% случаев был достигнут ПО. В группе пациентов с саркомами мягких тканей ($n = 36$) частота объективного ответа составила 81%, а у пациентов с инфантильной фибросаркомой ($n = 29$) – 96% [25]. В дополнение к длительному эффекту ларотректиниб продемонстрировал короткий временной интервал до констатации ответа [25, 26]. Медиана времени до ответа в исследовании D.S. Hong и соавт. составила 1,8 мес (разброс 0,9–6,1 мес). L. Mascarenhas и соавт. в 2022 г. опубликовали данные анализа эффективности ларотректиниба отдельно для педиатрической группы пациентов из клинических исследований SCOUT и NAVIGATE ($n = 93$), продемонстрировав частоту объективного ответа 84%, включая 38% ПО с медианой продолжительности 43,3 мес [27].

Энтректиниб – селективный мультикиназный ингибитор рецепторных тирозинкиназ TRKA/B/C, ROS1 и ALK [28]. Клиническая эффективность энтректиниба изучалась у взрослых пациентов старше 18 лет с нерезектабельными или метастатическими солидными опухолями с наличием транслокаций *NTRK1/2/3*, *ROS1* и *ALK* в 3 отдельных клинических исследованиях (ALKA, STARTRK-1 и STARTRK-2) [29, 30]. Результаты долгосрочного анализа эффективности энтректиниба у взрослых пациентов были опубликованы M. Krzakowski и соавт. в 2022 г. и продемонстрировали частоту объективного ответа 61,3% с медианой продолжительности 20 мес [31]. Необходимо отметить, что частота объективных ответов не различалась в группах пациентов с метастазами в ЦНС ($n = 31$, частота объективных ответов 61,3%) и без метастазов в ЦНС ($n = 119$, частота объективных ответов 61,3%). Частота интракраниальных ответов у пациентов с измеримыми метастазами в ЦНС составила 69,2%, включая 23,1% больных с полным интракраниальным ответом. Эффективность и безопасность энтректиниба в детской популяции была оценена в клиническом исследовании STARTRK-NG, куда были включены пациенты в возрасте младше 22 лет с экстракраниальными солидными опухолями или первичными опухолями ЦНС с наличием перестроек генов *NTRK1/2/3*, а также *ROS1* или *ALK* ($n = 43$) [32]. Частота объективных ответов составила 57,7%. Согласно обновленным данным, представленным A.V. Desai и соавт. на конгрессе Международного общества детских

онкологов (SIOP) в 2022 г., включившим в анализ эффективности энтректиниба 36 пациентов, частота объективных ответов была равна 61,1%, из них ПО отмечены в 9 (25%) случаях. Медиана длительности наблюдения за пациентами составила 24,3 мес. Важным является то, что время до ответа также было очень коротким (1,9 мес), медиана длительности ответа была равна 25,4 мес [33]. Стоит отметить, что энтректиниб продемонстрировал высокую эффективность в подгруппе пациентов с *NTRK*-перестроенными опухолями ($n = 23$): частота объективных ответов – 60,9%, из них ПО – 30,4% [33]. Необходимо подчеркнуть, что прямые сравнительные исследования ларотрекениба и энтректиниба не проводились, а интерпретация результатов описанных выше клинических исследований должна проводиться, учитывая различные популяции больных, включенных в анализ, в том числе удельный вес пациентов с опухолями ЦНС.

Как уже отмечалось выше, в настоящее время TRK-ингибиторы одобрены в Российской Федерации к применению в различных возрастных группах, включая пациентов детского возраста (энтректиниб с 12 лет, ларотрекениб с 3 лет), независимо от гистологического типа опухоли при условии выявления перестроек генов *NTRK1/2/3* (tumor-agnostic therapy). Появление нового класса высокоактивных препаратов диктует необходимость проведения молекулярно-генетических исследований в целях своевременного (в клинически значимые сроки) получения информации о статусе генов *NTRK*. Так, эксперты ведущих международных онкологических обществ опубликовали рекомендации на основе консенсуса по диагностике *NTRK*-перестроенных солидных опухолей и клиническому применению TRK-ингибиторов [34]. Авторы подчеркивают важность проведения тестирования до или после инициации стандартной терапии у пациентов с распространенными формами солидных опухолей. При этом предложено выделение 4 групп пациентов для поиска перестроек генов *NTRK*: пациенты с нерезектабельными и метастатическими солидными опухолями без известных драйверных альтераций (мутации, транслокации и амплификации); пациенты с нерезектабельными и метастатическими солидными опухолями с высокой частотой выявления перестроек *NTRK*; пациенты с нерезектабельными и метастатическими солидными опухолями, отличными от перечисленных выше групп; пациенты с местно-распространенными солидными опухолями с высокой частотой выявления перестроек *NTRK*, которым проводится неoadъювантная терапия [34].

В настоящее время регламентированные сроки использования TRK-ингибиторов отсутствуют, длительность терапии может варьировать от нескольких месяцев до 1 года и более. Отдельное

внимание уделяется сравнительному анализу эффективности терапии TRK-ингибиторами в зависимости от сроков назначения и стадии опухолевого процесса. Так, в исследовании С. Vokemeuer и соавт. с включением 164 пациентов было продемонстрировано достижение стойкого ответа на терапию ларотрекенибом независимо от количества линий предшествующей терапии, продолжительности или течения заболевания [35]. Согласно результатам данного анализа, частота объективных ответов во взрослой популяции пациентов с 0, 1–2 и ≥ 3 предшествующими линиями терапии составила 86%, 63% и 80% соответственно и соотносилась с частотой объективных ответов в группе пациентов с различной длительностью наблюдения до начала терапии ларотрекенибом. Представленные данные подчеркивают возможность использования TRK-ингибиторов у предлеченных пациентов и при различной длительности заболевания с той же эффективностью, а профиль токсичности соответствует результатам предыдущих исследований [25, 35]. Кроме того, на основании анализа времени от момента постановки диагноза до развития местно-распространенной/метастатической стадии заболевания авторами данной работы сделано предположение, что перестройки генов *NTRK* не являются прогностическим признаком благоприятных исходов [35].

В связи с тем, что в данный момент нет ни одного исследования для сравнения TRK-ингибиторов со стандартными подходами к терапии, эксперты ESMO не рекомендуют назначать их в рамках первой линии, имея альтернативу в виде стандартной опции лечения [34]. В связи с этим интересными представляются данные непрямого сравнительного исследования эффективности TRK-ингибиторов и стандартной терапии у взрослых пациентов с распространенными формами *NTRK*-перестроенных ЗНО [36]. Сформированные когорты больных, сопоставимые по своим исходным характеристикам, включали пациентов, получавших ларотрекениб ($n = 85$) и стандартную терапию ($n = 28$). Было показано, что применение ларотрекениба снижало риск развития смерти на 78%, медиана общей выживаемости в этой группе составила 39,7 мес (95% доверительный интервал (ДИ) 16,4 – не достигнут), тогда как у пациентов при проведении стандартной терапии она была равна 10,2 мес (95% ДИ 7,2–14,1) [36].

Как уже было подчеркнуто выше, TRK-ингибиторы показали свою эффективность у детей с нерезектабельными и метастатическими формами *NTRK*-перестроенных новообразований. В публикации S.G. DuBois и соавт. продемонстрирована возможность использования ларотрекениба в качестве неoadъювантной терапии, что в последующем позволило провести органосохраняющее хирург-

гическое лечение [37]. В исследование включены 5 пациентов: 3 с инфантильной фибросаркомой и 2 с другими саркомами мягких тканей. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 9 месяцев (разброс 1 месяц – 12 лет). Во всех случаях подтверждено наличие перестройки гена, принадлежащего к семейству *NTRK*: *ETV6::NTRK3* в 2/5 случаях, *TPM3::NTRK1* в 1/5, *PDE4DIP::NTRK1* в 1/5, *SQSTM1::NTRK1* в 1/5. Предшествующая системная терапия проведена у 4/5 пациентов, в 1 случае ларотректиниб применялся в качестве первой линии, при этом хирургическое лечение до начала использования ларотректиниба выполнено в 2/5 случаях. Медиана длительности терапии до хирургического лечения составила 6 циклов (разброс 4–9 циклов). Объективный ответ на терапию ларотректинибом зафиксирован во всех случаях (согласно критериям RECIST). Объем хирургической резекции: в 3/5 случаях – R0, в 1/5 – R1 и в 1/5 – R2. Два пациента продолжили получать терапию ларотректинибом в адьювантном режиме в связи с положительными краями резекции (R1/R2) [37].

Вышеперечисленные данные указывают на необходимость определения места TRK-ингибиторов в стандартных программах лечения целого ряда солидных опухолей у детей. Наиболее изучен данный вопрос у пациентов с инфантильной фибросаркомой как наиболее частой экстракраниальной солидной опухолью, включенной в проспективные клинические исследования TRK-ингибиторов. Традиционная стратегия лекарственной терапии инфантильной фибросаркомы показала высокую эффективность, согласно данным большого количества исследований, однако использование различных режимов химиотерапии, в том числе на основе антрациклинов и алкилирующих агентов, связано с целым рядом острых и отсроченных побочных эффектов [38–40]. За последние несколько лет знания о молекулярном ландшафте инфантильной фибросаркомы расширились благодаря развитию методов молекулярно-генетического тестирования и их доступности. Так, для инфантильной фибросаркомы были описаны генетические aberrации с вовлечением генов, участвующих в активации сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), включая *MET*, *RET*, *ALK*, *ABL1*, *BRAF* и *RAF1*, а также точечные мутации и инсерции в гене *BRAF* [41]. Кроме того, помимо классической для инфантильной фибросаркомы перестройки *ETV6::NTRK3* были обнаружены другие aberrации генов семейства *NTRK*, включая *NTRK1*, *NTRK2* и альтернативные химерные гены с участием *NTRK3*. Полученные данные указывают на необходимость пересмотра концепции молекулярно-генетического тестирования, а также, учитывая возрастающую роль использования селективных ингибиторов в общей

стратегии лечения инфантильной фибросаркомы, пересмотр имеющихся рекомендаций по терапии. В исследовании D. Orbach и соавт. проанализированы результаты традиционной терапии инфантильной фибросаркомы в сравнении с TRK-ингибиторами, обсуждены преимущества и недостатки обеих стратегий, а также в рамках данной работы представлены рекомендации по использованию TRK-ингибиторов у пациентов с данным типом опухоли. Так, применение TRK-ингибиторов в первой линии терапии предлагается при метастатической форме заболевания или при наличии жизнеугрожающих симптомов (риск разрыва опухоли, развития кровотечения и т. д.). При первично нерезектабельных локализованных формах заболевания возможно использование стандартных режимов ПХТ или TRK-ингибиторов по усмотрению врачей и родителей пациента. Также рекомендовано использование TRK-ингибиторов при неэффективности предшествующей ПХТ или в случае развития тяжелых токсических побочных эффектов, таких как веноокклюзионная болезнь печени, нейропатия [42]. В настоящее время Детская онкологическая группа (Children's Oncology Group, COG) проводит клиническое исследование, направленное на изучение эффективности ларотректиниба в первой линии терапии у пациентов с инфантильной фибросаркомой и другими *NTRK*-перестроенными солидными опухолями [43].

В описанной нами группе пациентов все случаи были представлены различными опухолями мягких тканей с равным распределением гистологических вариантов между инфантильной фибросаркомой и *NTRK*-перестроенными новообразованиями. В 7 случаях терапия энтректинибом была инициирована после проведения предшествующей системной терапии и в ряде случаев хирургического лечения, при этом у 6 пациентов на момент назначения препарата определялась измеряемая остаточная опухоль. В 1 случае энтректиниб использовался в качестве первой линии терапии. Полученные нами данные подтверждают высокую эффективность энтректиниба, поскольку в 6 случаях был констатирован объективный ответ. У пациента с параменингеальной инфантильной фибросаркомой была отмечена СЗ, однако последующая биопсия остаточных изменений не выявила витальных опухолевых клеток. В другом случае у ребенка с интраторакальной инфантильной фибросаркомой энтректиниб позволил улучшить ответ, полученный при применении стандартной противоопухолевой терапии, что, в свою очередь, позволило выполнить отсроченную операцию. Интересным представляется то, что при плановом гистологическом исследовании также был продемонстрирован патоморфоз IV степени. Необходимо отметить, что исследование, оценивающее характер

патоморфологического ответа у пациентов, получающих различные тирозинкиназные ингибиторы, включая TRK, продемонстрировало в большинстве случаев снижение клеточности опухоли с отсутствием витальных опухолевых клеток в 5/8 проанализированных образцах [44]. В других описанных нами случаях, несмотря на значительный регресс опухоли, резидуальные изменения характеризовались сложной анатомической локализацией, что препятствовало их морфологической оценке.

Тем не менее, несмотря на достигнутые клинически значимые успехи в разработке и внедрении TRK-ингибиторов, целый ряд вопросов требуют ответа, в частности длительность терапии у пациентов с нерезектабельной опухолью, возможность комбинированного использования TRK-ингибиторов с классическими цитостатическими препаратами, частота развития вторичной резистентности, а также частота и спектр отдаленных побочных эффектов терапии [24].

Первичная резистентность к TRK-ингибиторам первого поколения у педиатрических пациентов является редким событием, тем не менее в научной литературе описаны механизмы развития резистентности, связанные с формированием вторичных мутаций в кодирующей последовательности киназного домена гена, участвующего в перестройке [45]. В случае развития устойчивости на фоне предшествующей терапии TRK-ингибиторами может быть рекомендовано использование TRK-ингибиторов последующих поколений. В настоящее время имеются свидетельства эффективности данного подхода [46]. Препараты второго поколения характеризуются большей аффинностью к рецептору и, по предварительным данным исследований I/II фазы, показали свою эффективность в отношении пациентов, имеющих прогрессию заболевания на фоне терапии TRK-ингибиторами первого поколения [47, 48]. В нашей когорте случаев развития резистентности к энтректинибу отмечено не было.

Основные физиологические процессы, контролируемые рецепторами группы TRK, включают контроль аппетита, массы тела и болевой чувствительности, тем самым TRK-ингибиторы связаны с относительно уникальным набором нежелательных явлений, которые не имеют сходства с другими противоопухолевыми препаратами [49]. Безопасность TRK-ингибиторов лучше всего охарактеризована для ларотректиниба и энтректиниба, принимая во внимание большую когорту пациентов, вошедших в клинические исследования, по оценке эффективности данных лекарственных средств. Оба препарата показали благоприятные профили токсичности [30, 50]. По сравнению с другими TRK-ингибиторами частота нежелательных явлений, связанных

с приемом препаратов энтректиниба или ларотректиниба, была низкой. Например, частота возникновения тошноты, диареи и повышение печеночных трансаминаз была ниже при приеме энтректиниба или ларотректиниба, чем при приеме кризотиниба [49]. Модификация доз или отмена препарата, возможно, представляют собой наилучшие интегрированные показатели общей переносимости. Так, частота снижения дозы энтректиниба составила 27%, ларотректиниба – 9%, кризотиниба – 21% [49]. Частота прекращения лечения была неизменно ниже при применении как энтректиниба (4%), так и ларотректиниба (< 1%), чем при использовании кризотиниба (13%) [49]. Головокружение возникает примерно у 16–25% пациентов [46]. Парестезии отмечались в 19% случаев при применении энтректиниба [49]. Также наблюдается увеличение веса ввиду того, что рецептор TRKB участвует в регуляции аппетита, а нарушение его активности вызывает гиперфагию, ожирение и гипердиспсию. У детей показатели частоты увеличения массы тела выше в сравнении со взрослой популяцией: 28% против 19% [49]. Согласно недавно опубликованным данным клинического исследования педиатрической популяции STARTRK-NG, наиболее частой причиной снижения дозы энтректиниба было увеличение массы тела, что, в свою очередь, могло быть связано с возникновением другого нежелательного явления – переломов костей скелета [32]. Когнитивные нарушения III степени были описаны при применении энтректиниба у взрослого пациента, получавшего дозу препарата, превышающую рекомендуемую, что согласуется с тем фактом, что рецептор TRKB играет роль в модуляции памяти и настроения [29]. Нельзя не упомянуть, что ингибиторы TRK были впервые разработаны как анальгезирующие препараты [51]. Тем самым они могут изменять болевую чувствительность, и пациенты, которые прекращают или продолжают принимать препараты, должны наблюдаться на предмет возможных обострений болевых ощущений. Требуется дальнейшие исследования, направленные на изучение долгосрочных токсических эффектов терапии, в первую очередь влияния на ЦНС, особенно у пациентов раннего возраста, длительно получающих терапию. В нашем исследовании все нежелательные явления были контролируемые и купируемые при их возникновении, в ряде случаев требовалась редукция дозы препарата.

Конечно же, говоря о противоопухолевой терапии, нельзя не затронуть тему качества жизни, так как его поддержание или улучшение на фоне лечения путем уменьшения боли и других симптомов является ключевой целью. Персонализированная терапия, имея преимущества в эффективности, не должна сопровождаться дополнительной токсичностью. S. Kummar

и соавт. в 2021 г. опубликовали данные об изменении качества жизни пациентов на фоне терапии ларотрентинибом [52]. Дети и взрослые в возрасте от 2 до 19 лет в клинических исследованиях SCOUT и NAVIGATE ($n = 17$) заполняли анкеты с последующей оценкой. Значимое улучшение отмечено у 13/17 (76%) пациентов. Улучшение наблюдалось в течение первых 2 курсов терапии у 12/17 (71%) больных и длилось более 2 курсов в 65% случаев [52]. В нашем исследовании были пациенты раннего возраста с параменнгеальной локализацией опухоли больших размеров, что вызывало деформацию костей лицевой части черепа, в 1 случае наблюдался выраженный односторонний экзофтальм, который купировался на фоне терапии энтретинибом, что демонстрирует достижение косметического эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение хотелось бы отметить, что настоящее исследование продемонстрировало первый успешный опыт применения энтретиниба у российских пациентов детского возраста с экстракраниальными *NTRK*-перестроенными опухолями различной локализации, включенными в программу расширенного доступа препарата. Энтретиниб был эффективен как у первичных пациентов, так и в популяции больных, получавших различные режимы противоопухолевой терапии. Полученные нами данные подтвердили уже известный профиль токсичности препарата и продемонстрировали безопасность его

применения с возможностью модификации дозового режима у части пациентов при развитии нежелательных побочных явлений, но без снижения эффективности лечения и качества жизни. Важно отметить, что в настоящее время энтретиниб одобрен экспертным советом благотворительного фонда «Круг добра» к применению у пациентов с солидными опухолями с перестройками генов *NTRK1/2/3* при неэффективности стандартной терапии, необходимости выполнения калечащих хирургических вмешательств или отсутствии альтернативных эффективных вариантов лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Stradomskaya T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0621-191X>
Suleymanova A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5489-1879>
Kononov D.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7732-8184>
Druy A.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>
Panfyorova A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8580-3499>
Preobrazhenskaya E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1941-0491>
Andreeva N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5626-218X>
Sagoyan G.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7846-3473>
Teleshova M.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4042-0125>
Smirnova L.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9625-8625>
Zacarinnyaya O.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2670-547X>
Shamanskaya T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3767-4477>
Grachev N.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4451-3233>
Rubanskaya M.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1016-539X>
Kirgizov K.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2945-284X>
Imyanitov E.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>
Varfolomeeva S.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>
Kachanov D.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3704-8783>

Литература

- Okamura R., Boichard A., Kato S., Sicklick J.K., Bazhenova L., Kurzrock R. Analysis of *NTRK* Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for *NTRK*-Targeted Therapeutics. *JCO Precis Oncol* 2018; 2018: P0.18.00183. DOI: 10.1200/PO.18.00183
- Westphalen C.B., Krebs M.G., Le Tourneau C., Sokol E.S., Maund S.L., Wilson T.R., et al. Genomic context of *NTRK1/2/3* fusion-positive tumours from a large real-world population. *NPJ Precis Oncol* 2021; 5 (1): 69. DOI: 10.1038/s41698-021-00206-y
- Zhao X., Kotch C., Fox E., Surrey L.F., Wertheim G.B., Baloch Z.W., et al. *NTRK* Fusions Identified in Pediatric Tumors: The Frequency, Fusion Partners, and Clinical Outcome. *JCO Precis Oncol* 2021; 1: P0.20.00250. DOI: 10.1200/PO.20.00250
- Amatu A., Sartore-Bianchi A., Siena S. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 2016; 1 (2): e000023. DOI: 10.1136/esmoopen-2015-000023
- Cocco E., Scaltriti M., Drilon, A. *NTRK* fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15: 731–47. DOI: 10.1038/s41571-018-0113-0
- Amatu A., Sartore-Bianchi A., Ben-cardino K., Pizzutilo E.G., Tosi F., Siena S. Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of *NTRK* gene fusions in cancer. *Ann Oncol* 2019; 30 (Suppl_8): viii5–15. DOI: 10.1093/annonc/mdz383
- Vaishnavi A., Le A.T., Doebele R.C. TRKING down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* 2015; 5 (1): 25–34. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0765
- Martin-Zanca D., Hughes S.H., Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986; 319 (6056): 743–8. DOI: 10.1038/319743a0
- Knezevich S.R., McFadden D.E., Tao W., Lim J.F., Sorensen P.H. A novel *ETV6-NTRK3* gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet* 1998; 18 (2): 184–7. DOI: 10.1038/ng0298-184
- Stransky N., Cerami E., Schalm S., Kim J.L., Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer.

- Nat Commun 2014; 5: 4846. DOI: 10.1038/ncomms5846
11. Kheder E.S., Hong D.S. Emerging Targeted Therapy for Tumors with *NTRK* Fusion Proteins. Clin Cancer Res 2018; 24 (23): 5807–14. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1156
 12. Sbaraglia M., Bellan E., Dei Tos A.P. The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: news and perspectives. Pathologica 2021; 113 (2): 70–84. DOI: 10.32074/1591-951X-213
 13. Kummar S., Lassen U.N. TRK Inhibition: A New Tumor-Agnostic Treatment Strategy. Target Oncol 2018; 13 (5): 545–56. DOI: 10.1007/s11523-018-0590-1
 14. Marchiò C., Scaltriti M., Ladanyi M., Iafrate A.J., Bibeau F., Dietel M., et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect *NTRK* fusions in daily practice and clinical research. Ann Oncol 2019; 30 (9): 1417–27. DOI: 10.1093/annonc/mdz204
 15. Siozopoulou V., Smits E., De Winne K., Marcq E., Pauwels P. *NTRK* Fusions in Sarcomas: Diagnostic Challenges and Clinical Aspects. Diagnostics (Basel) 2021; 11 (3): 478. DOI: 10.3390/diagnostics11030478
 16. Иванов Н.С., Панферова А.В., Коновалов Д.М., Телешова М.В., Большаков Н.А., Шаманская Т.В. и др. Врожденная инфантильная фибросаркома с неканоническим химерным транскриптом *TPM3-NTRK1*: описание клинического случая и обзор литературы. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (1): 110–20. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-1-110-120
 17. Kao Y.C., Sung Y.S., Argani P., Swanson D., Alaggio R., Tap W., et al. *NTRK3* overexpression in undifferentiated sarcomas with *YWHAE* and *BCOR* genetic alterations. Mod Pathol 2020; 33 (7): 1341–9. DOI: 10.1038/s41379-020-0495-2
 18. Solomon J.P., Benayed R., Hechtman J.F., Ladanyi M. Identifying patients with *NTRK* fusion cancer. Ann Oncol 2019; 30 Suppl 8: viii16–22. DOI: 10.1093/annonc/mdz384
 19. Albert C.M., Davis J.L., Federman N., Casanova M., Laetsch T.W. TRK Fusion Cancers in Children: A Clinical Review and Recommendations for Screening. J Clin Oncol 2019; 37 (6): 513–24. DOI: 10.1200/JCO.18.00573
 20. Hofman P. What Is New in Biomarker Testing at Diagnosis of Advanced Non-Squamous Non-Small Cell Lung Carcinoma? Implications for Cytology and Liquid Biopsy. J Mol Pathol 2021; 2: 147–72. DOI: 10.3390/jmp2020015
 21. Kurihara T., Suehara Y., Akaike K., Hayashi T., Kohsaka S., Ueno T., et al. Nanostring-based screening for tyrosine kinase fusions in inflammatory myofibroblastic tumors. Sci Rep 2020; 10: 18724. DOI: 10.1038/s41598-020-75596-3
 22. Van der Velden D.L., van Herpen C.M.L., van Laarhoven H.W.M., Smit E.F., Groen H.J.M., Willems S.M., et al. Molecular Tumor Boards: current practice and future needs. Ann Oncol 2017; 28 (12): 3070–5. DOI: 10.1093/annonc/mdx528
 23. Offin M., Liu D., Drilon A. Tumor-Agnostic Drug Development. Am Soc Clin Oncol Educ Book 2018; 38: 184–7. DOI: 10.1200/EDBK_200831
 24. Shulman D.S., DuBois S.G. The Evolving Diagnostic and Treatment Landscape of *NTRK*-Fusion-Driven Pediatric Cancers. Paediatr Drugs 2020; 22 (2): 189–97. DOI: 10.1007/s40272-020-00380-9
 25. Hong D.S., DuBois S.G., Kummar S., Farago A.F., Albert C.M., Rohrbach K.S., et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. Lancet Oncol 2020; 21 (4): 531–40. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30856-3
 26. Bielack S.S., Cox M.C., Nathrath M., Apel K., Blattmann C., Holl T., et al. Rapid, complete and sustained tumour response to the TRK inhibitor larotrectinib in an infant with recurrent, chemotherapy-refractory infantile fibrosarcoma carrying the characteristic *ETV6-NTRK3* gene fusion. Ann Oncol 2019; 30 (Suppl 8): viii31–5. DOI: 10.1093/annonc/mdz382
 27. Mascarenhas L., Martinus van Tilburg C., Doz F., Zwaan C.M., Albert C.M., Blattman C., et al. Efficacy and safety of larotrectinib in pediatric patients with tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion-positive cancer: An expanded dataset. J Clin Oncol 2022; 40 (suppl 16): 10030. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.10030
 28. Ardini E., Menichincheri M., Banfi P., Bosotti R., De Ponti C., Pulci R., et al. Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. Mol Cancer Ther 2016; 15 (4): 628–39. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0758
 29. Drilon A., Salvatore S., Ou S.I., Patel M., Ahn M.J., Lee J., et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). Cancer Discov 2017; 7: 400–9. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-1237
 30. Demetri G.D., Paz-Ares L., Farago A.F., Liu S.V., Chawla S.P., Tosi D., et al. Efficacy and safety of entrectinib in patients with *NTRK* fusion-positive (*NTRK*-fp) Tumors: Pooled analysis of STARTRK-2, STARTRK-1 and ALKA-372-001. Ann Oncol 2018; 29: mdy424.017. DOI: 10.1093/annonc/mdy1424.1017
 31. Krzakowski M.J., Lu S., Cousin S., Smit E.F., Springfield C., Goto K., et al. Updated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in patients (pts) with locally advanced/metastatic *NTRK* fusion-positive (*NTRK*-fp) solid tumors. J Clin Oncol 2022; 40 (16_suppl): 3099. DOI: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.3099
 32. Desai A.V., Robinson G.W., Gauvain K., Basu E.M., Macy M.E., Maese L., et al. Entrectinib in children and young adults with solid or primary CNS tumors harboring *NTRK*, *ROS1*, or *ALK* aberrations (STARTRK-NG). Neuro Oncol 2022; 24 (10): 1776–89. DOI: 10.1093/neuonc/noac087
 33. Desai A., Robinson G., Basu E., Foster J., Sabnis A., Maese L., et al. Entrectinib in children, adolescents and young adults with extracranial solid or primary CNS tumours harbouring *NTRK1/2/3*, *ROS1*, or *ALK* fusions: updated data from STARTRK-NG. 54th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) September 28 – October 1, 2022. Pediatric Blood Cancer 2022; 69 (S5): S314–5.
 34. Yoshino T., Pentheroudakis G., Mishima S., Overman M.J., Yeh K.H., Baba E., et al. JSCO-ES-

- MO-ASCO-JSMO-TOS: international expert consensus recommendations for tumour-agnostic treatments in patients with solid tumours with microsatellite instability or *NTRK* fusions. *Ann Oncol* 2020; 31 (7): 861–72. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.03.299
35. Bokemeyer C., Vassal G., Italiano A., De La Cuesta E., Hiemeyer F., Fellous M., Marian M. Impact of Disease Evolution on Efficacy Outcomes From Larotrectinib in Patients With Locally Advanced or Metastatic Tropomyosin Receptor Kinase Fusion-Positive Solid Tumors. *JCO Precis Oncol* 2021; 5: PO.21.00089. DOI: 10.1200/PO.21.00089
 36. Bokemeyer C., Paracha N., Lassen U., Italiano A., Sullivan S.D., Marian M., et al. Survival Outcomes of Patients With Tropomyosin Receptor Kinase Fusion-Positive Cancer Receiving Larotrectinib Versus Standard of Care: A Matching-Adjusted Indirect Comparison Using Real-World Data. *JCO Precis Oncol* 2023; 7: e2200436. DOI: 10.1200/PO.22.00436
 37. DuBois S.G., Laetsch T.W., Federman N., Turpin B.K., Albert C.M., Nagasubramanian R., et al. The use of neoadjuvant larotrectinib in the management of children with locally advanced TRK fusion sarcomas. *Cancer* 2018; 124 (21): 4241–7. DOI: 10.1002/cncr.31701
 38. Orbach D., Rey A., Cecchetto G., Oberlin O., Casanova M., Thebaud E., et al. Infantile fibrosarcoma: management based on the European experience. *J Clin Oncol* 2010; 28 (2): 318–23. DOI: 10.1200/JCO.2009.21.9972
 39. Orbach D., Brennan B., De Paoli A., Gallego S., Mudry P., Francotte N., et al. Conservative strategy in infantile fibrosarcoma is possible: The European paediatric Soft tissue sarcoma Study Group experience. *Eur J Cancer* 2016; 57: 1–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.12.028
 40. Sparber-Sauer M., Vokuhl C., Seitz G., Stegmaier S., Hallmen E., von Kalle T., et al.; CWS Study Group. The impact of local control in the treatment of children with advanced infantile and adult-type fibrosarcoma: Experience of the cooperative weichteilsarkom studien-gruppe (CWS). *J Pediatr Surg* 2020; 55 (9): 1740–7. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2019.10.051
 41. Davis J.L., Al-Ibraheemi A., Rudzinski E.R., Surrey L.F. Mesenchymal neoplasms with *NTRK* and other kinase gene alterations. *Histopathology* 2022; 80 (1): 4–18. DOI: 10.1111/his.14443
 42. Orbach D., Sparber-Sauer M., Laetsch T.W., Minard-Colin V., Bielack S.S., Casanova M., et al. Spotlight on the treatment of infantile fibrosarcoma in the era of neurotrophic tropomyosin receptor kinase inhibitors: International consensus and remaining controversies. *Eur J Cancer* 2020; 137: 183–92. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.06.028
 43. Larotrectinib in Treating Patients With Previously Untreated TRK Fusion Solid Tumors and TRK Fusion Relapsed Acute Leukemia. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03834961.
 44. Baranov E., Winsnes K., O'Brien M., Voss S.D., Church A.J., Janeway K.A., et al. Histologic characterization of paediatric mesenchymal neoplasms treated with kinase-targeted therapy. *Histopathology* 2022; 81 (2): 215–27. DOI: 10.1111/his.14680
 45. Fuse M.J., Okada K., Oh-Hara T., Ogura H., Fujita N., Katayama R. Mechanisms of Resistance to *NTRK* Inhibitors and Therapeutic Strategies in *NTRK1*-Rearranged Cancers. *Mol Cancer Ther* 2017; 16 (10): 2130–43. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0909
 46. Drilon A., Ou S.I., Cho B.C., Kim D.W., Lee J., Lin J.J., et al. Repotrectinib (TPX-0005) Is a Next-Generation ROS1/TRK/ALK Inhibitor That Potently Inhibits ROS1/TRK/ALK Solvent – Front Mutations. *Cancer Discov* 2018; 8 (10): 1227–36. DOI: 10.1158/2159-8290
 47. Russo M., Misale S., Wei G., Siravegna G., Crisafulli G., Lazzari L., et al. Acquired Resistance to the TRK Inhibitor Entrectinib in Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 2016; 6 (1): 36–44. DOI: 10.1158/2159-8290
 48. Cocco E., Schram A.M., Kulick A., Misale S., Won H.H., Yaeger R., et al. Resistance to TRK inhibition mediated by convergent MAPK pathway activation. *Nat Med* 2019; 25 (9): 1422–7. DOI: 10.1038/s41591-019-0542-z
 49. Liu D., Flory J., Lin A., Offin M., Falcon C.J., Murciano-Goroff Y.R., et al. Characterization of on-target adverse events caused by TRK inhibitor therapy. *Ann Oncol* 2020; 31 (9): 1207–15. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.05.006
 50. Lassen U.N., Albert C.M., Kummar S., van Tilburg C.M., Dubois S.G., Georger B., et al. Larotrectinib efficacy and safety in TRK fusion cancer: an expanded clinical dataset showing consistency in an age and tumor agnostic approach. *Ann Oncol* 2018; 29 (Suppl_8): viii133–48. DOI: 10.1093/annonc/mdy279
 51. Ashraf S., Bouhana K.S., Pheneger J., Andrews S.W., Walsh D.A. Selective inhibition of tropomyosin-receptor-kinase A (TrkA) reduces pain and joint damage in two rat models of inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016; 18 (1): 97. DOI: 10.1186/s13075-016-0996-z
 52. Kummar S., Berlin J., Mascarenhas L., van Tilburg C.M., Georger B., Lassen U.N., et al. Quality of Life in Adult and Pediatric Patients with Tropomyosin Receptor Kinase Fusion Cancer Receiving Larotrectinib. *Curr Probl Cancer* 2021; 45 (6): 100734. DOI: 10.1016/j.currprobcancer.2021.100734

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-121-129

Опыт использования аналога соматостатина и иммуносупрессивной терапии в лечении сложных форм хилоперитонеума и хилоторакса у новорожденных и детей грудного возраста

А.С. Гурская¹, М.А. Сулавко¹, Р.Р. Баязитов¹, И.В. Карнута¹, Е.В. Екимовская¹, О.Н. Наковкин¹, Д.М. Ахмедова¹, А.А. Клепикова¹, Р.А. Хагуров², Н.В. Петрова¹, В.А. Скворцова¹

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

²ГБУЗ г. Москвы «Детская городская клиническая больница им. Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Хилоперитонеум и хилоторакс – редкие патологические состояния с высокой летальностью, методика лечения которых однозначно не определена. Цель исследования – выполнить анализ опыта применения синтетического аналога соматостатина – октреотида и иммуносупрессивной терапии сиролимусом у детей при лечении хилоперитонеума и хилоторакса. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Родители пациентов дали согласие на использование информации, в том числе фотографий детей, в научных исследованиях и публикациях. Проведен ретроспективный анализ 9 историй болезни детей с врожденным хилоперитонеумом и хилотораксом за период с 2018 по 2022 г. Всем детям при выявлении хилезного выпота выполнялось дренирование, осуществлялся перевод на полное парентеральное питание, назначалась консервативная терапия. Первая линия консервативной терапии – октреотид в течение 14–20 дней, при отсутствии эффекта назначался сиролимус. Эффект от консервативной терапии октреотидом в дозировке 5–10 мкг/кг/ч получен в 5 наблюдениях, в случае отсутствия положительной динамики на 14-е сутки назначалась терапия сиролимусом в дозировке 0,05–0,2 мг/сут, которая дала положительный результат во всех наблюдениях ($n = 4$). Наше исследование демонстрирует, что терапия сиролимусом оказывается эффективной в сложных случаях хилоперитонеума и хилоторакса у детей даже в периоде новорожденности. В связи с редкостью данной патологии вывод основан на небольшой серии случаев. Для подтверждения наших выводов и выработки общепринятого протокола диагностики и лечения не хватает целенаправленных многоцентровых исследований. До разработки клинических рекомендаций по терапии хилоперитонеума и хилоторакса назначение иммуносупрессивной терапии следует рассматривать индивидуально и по решению врачебной комиссии учреждения.

Ключевые слова: хилоперитонеум, хилоторакс, октреотид, сиролимус, новорожденные

Гурская А.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 121–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-121-129

A somatostatin analogue and immunosuppressive therapy in the treatment of complex forms of chyloperitoneum and chylothorax in newborns and infants

A.S. Gurskaya¹, M.A. Sulavko¹, R.R. Bayazitov¹, I.V. Karnuta¹, E.V. Ekimovskaya¹, O.N. Nakovkin¹, D.M. Akhmedova¹, A.A. Klepikova¹, R.A. Khagurov², N.V. Petrova¹, V.A. Skvortsova¹

¹National Medical Research Center for Children's Health of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²The N.F. Filatov Children's Clinical Hospital of Department of Health of Moscow, Moscow

Chyloperitoneum and chylothorax are rare conditions with high mortality rates whose optimal treatment strategy remains unclear. The aim of the study was to evaluate the results of chyloperitoneum and chylothorax treatment with a synthetic somatostatin analogue (octreotide) and immunosuppressive therapy with sirolimus. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the National Medical Research Center for Children's Health of Ministry of Healthcare of Russia. The patients' parents gave their consent to the use of their children's data, including photographs, for research purposes and in publications. We conducted a retrospective study of nine children diagnosed with congenital chyloperitoneum and chylothorax who had been treated from 2018 to 2022. All the children received either abdominal or pleural drainage, parenteral nutrition, and conservative therapy with drugs. The first line of therapy was octreotide for 14–20 days that was then switched to sirolimus if there had been no effect. The effectiveness of conservative therapy with octreotide at a dose of 5–10 µg/kg/hour was observed in 5 cases. If there had been no effect by day 14, the patients were started on sirolimus at a dose of 0.05–0.2 mg/day which proved to be effective in all the patients ($n = 4$). Our study showed that sirolimus is effective in complex cases of chyloperitoneum and chylothorax in newborns and infants. Because of the rarity of these disorders, our conclusions were based on the analysis of a small cohort. To confirm our results and develop uniform diagnostic and treatment guidelines, further, more targeted multicenter research is needed. Until such guidelines are adopted, decisions on the treatment of chyloperitoneum and chylothorax should be made on an individual basis and approved by the medical committee of a treatment center.

Key words: chyloperitoneum, chylothorax, octreotide, sirolimus, newborns

Gurskaya A.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 121–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-121-129

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 27.03.2023
Принята к печати 24.04.2023

Контактная информация:

Сулавко Мария Александровна,
врач-детский хирург ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России
Адрес: 119991, Москва,
Ломоносовский просп., 2, стр. 1
E-mail: sulavko.ma@nczd.ru

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 27.03.2023

Accepted 24.04.2023

Correspondence:

Maria A. Sulavko,
a pediatric surgeon at the National Medical Research Center for Children's Health of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 2 bldg. 1, Lomonosovsky Avenue, Moscow 119991, Russia
E-mail: sulavko.ma@nczd.ru

Хилоперитонеум (ХП) и хилоторакс (ХТ) – патологические состояния, проявляющиеся скоплением лимфатической жидкости в брюшной и грудной полостях соответственно. Принято различать первичный и вторичный хилезный выпот. Первичные состояния связывают либо с наличием врожденных пороков развития лимфатической системы, включающих в себя аномальную структуру лимфатического дерева или повышенную проницаемость стенки лимфатических сосудов, либо с незрелостью лимфатических сосудов и цистерн, что может способствовать транссудации. Наличие изменений в структуре лимфатического дерева (расширение или окклюзия сосудов, лимфангиомы) приводит к лимфостазу, повышению давления в просвете сосудов, что способствует лимфорее. Есть данные о связи ХП с генетическими синдромами Шерешевского–Тернера, Дауна, Клиппеля–Треноне–Вебера, Горэма, Нунан [1]. Врожденные пороки развития лимфатической системы, как правило, имеют подострое течение и носят прогрессирующий характер, поэтому симптомы заболевания к моменту рождения могут отсутствовать, в связи с чем хилезный выпот, возникший до 3 месяцев жизни, считается врожденным [2, 3].

Развитие вторичного хилезного выпота связано с травматическим разрывом лимфатического сосуда, повреждением при оперативном вмешательстве или постановке центральных венозных катетеров, а также с любыми состояниями, которые влекут за собой повышение давления в лимфатических сосудах (сдавление извне новообразованием, прорастание злокачественным образованием сосуда, хронический гепатит, цирроз печени, портальная гипертензия, туберкулез лимфатических узлов, спаечная болезнь) [4].

При исключении вторичных причин устанавливается диагноз первичного хилезного выпота.

Независимо от причины формирования хилезного выпота патологические потери при ХП и ХТ постепенно приводят к развитию водно-электролитных нарушений, гипоальбуминемии, анемии, лимфопении, нарушениям свертывающей системы крови. Количество неблагоприятных исходов при ХП и ХТ, по данным отечественных и зарубежных авторов, достигает 30–50% [3, 5–8].

Основными методами диагностики на современном этапе являются ультразвуковое исследование (УЗИ) или компьютерная томография и анализ состава полученной при дренировании жидкости. Критериями хилезного характера выпота принято считать высокое содержание триглицеридов, цитоз более $0,001 \times 10^9/\text{л}$ с преобладанием лимфоцитов до 80–90% [3, 8]. У новорожденных детей, которые не получали энтерального питания, повышение триглицеридов в дренажной жидкости может быть незначительным.

Общепринятого протокола лечения хилезных выпотов в настоящий момент не разработано. Лечение данных состояний начинают, как правило, с консервативных мероприятий. В первую очередь для уменьшения продукции лимфы показано назначение питания с полным исключением жиров [9], наиболее эффективным является перевод ребенка на полное парентеральное питание [1, 3, 4]. По некоторым литературным данным, часть хилезных выпотов может быть купирована путем назначения только парентерального питания на длительный срок (3–4 нед), но это несет в себе колоссальные риски поражения печени, атрофии кишечника, инфекционных осложнений, связанных с использованием центрального венозного катетера и стоянием дренажа.

Наиболее часто встречающимся в литературе консервативным методом лечения является назначение производного естественного гормона соматостатина – октреотида [4, 5, 8, 10]. Октреотид обладает аналогичными соматостатину фармакологическими эффектами, но значительно большей продолжительностью действия за счет удлинения периода полувыведения. Механизм снижения лимфообразования при применении соматостатина и октреотида не до конца изучен. Считается, что предотвращение лимфообразования происходит благодаря уменьшению секреции гормонов желудочно-кишечного тракта (секретин, гастрин и др.), снижению моторики кишечника и висцерального кровотока.

Учитывая отсутствие однозначных рекомендаций, длительность терапии определяется в каждом конкретном случае индивидуально и варьирует в широком диапазоне – от 1 до 8 нед, по данным различных литературных источников, однако, согласно нашим наблюдениям и по данным некоторых зарубежных авторов, при отсутствии тенденции к снижению количества отделяемого по дренажу в течение 5–6 дней эффекта от дальнейшего лечения ожидать не стоит. Серьезных побочных эффектов при использовании октреотида, как правило, не отмечается, однако ограниченный опыт длительного применения не дает возможности в настоящий момент адекватно оценить безопасность данного метода. Встречаются единичные публикации, описывающие развитие некротизирующего энтероколита на фоне введения октреотида, что связывают с увеличением сопротивления сосудов и снижением кровотока в кишечнике [11].

При неэффективности длительно проводимой консервативной терапии рассматривается вопрос об оперативном лечении. У взрослых пациентов возможно выполнение лимфографии в предоперационном периоде в целях обнаружения локализации источника лимфорееи, однако это удается далеко не всегда, а у детей грудного возраста лимфо-

графия не применяется в силу технических трудностей и серьезных побочных эффектов [4]. В случае выявления источника лимфорей при оперативном вмешательстве возможно наложение швов на лимфатический сосуд, успех в этом случае может достигать 85%. Если локализацию источника установить не удается либо имеются множественные дефекты, применяют фибриновый клей, что чревато развитием выраженного спаечного процесса и серьезных осложнений при попадании клея в системный кровоток [12]. У пациентов старшего возраста применяют химическое воздействие путем нанесения склерозанта (калиброванный тальк, тетрациклин, бетадин). Хирургическое лечение у детей грудного возраста оказывается неэффективным в большинстве случаев в силу наличия возрастных анатомических особенностей: у детей раннего возраста цистерна грудного протока выражена слабо, имеется рассыпной тип строения лимфатического дерева в брюшной полости.

Отсутствие надежного эффекта от описанной консервативной терапии и хирургического лечения обуславливает дальнейший поиск вариантов купирования хилезных выпотов. В этой связи был взят за основу успешный опыт применения сиролимуса в лечении сосудистых мальформаций, в том числе лимфангиом. Сиролимус является иммуносупрессивным и противоопухолевым средством, изначально использовавшимся как антибактериальный препарат. Действие сиролимуса связано с ингибированием mTOR-киназы (mammalian target of rapamycin), являющейся важнейшим ферментом регуляции клеточного цикла. При ингибировании mTOR клеточный цикл останавливается на границе периода покоя и фазы репликации ДНК. Кроме того, рапамицин выключает ответ эндотелиальных клеток на проангиогенные факторы, что значительно замедляет ангиогенез. Сиролимус ингибирует VEGF-индуцированную гиперпроницаемость микрососудов [13]. В связи с отсутствием клинических рекомендаций и соответствующих показаний в инструкции к препарату назначение проводится "off-label".

Цель исследования – оценить эффективность лечения и проанализировать практический опыт использования стандартной терапии октреотидом и иммуносупрессивной терапии сиролимусом в лечении ХП и ХТ у новорожденных и детей грудного возраста. В периоде новорожденности и у детей грудного возраста иммуносупрессивная терапия в целях купирования хилезного выпота применялась впервые в Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен ретроспективный анализ историй болезни детей, находившихся в хирургическом отде-

лении новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России за период с 01.01.2018 по 31.12.2022. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Родители пациентов дали согласие на использование информации, в том числе фотографий детей, в научных исследованиях и публикациях. Всего проанализировано 9 историй болезни. Возраст пациентов на момент выявления хилезного выпота составил от 4 до 162 дней, медиана – 42 дня. Девочек было 5, мальчиков – 4. На момент подготовки материала исследования все дети живы, возраст – от 7 месяцев до 4 лет.

Диагноз ХП/ХТ ставился на основании данных УЗИ органов брюшной полости, биохимического и цитологического анализов дренажной жидкости.

При выявлении ХП или ХТ для снижения выработки хилезной жидкости все дети переводились на полное парентеральное питание, назначалась консервативная терапия синтетическим аналогом соматостатина – октреотидом в дозировке 5–10 мкг/кг/ч, инфузия проводилась круглосуточно в отдельный от основной инфузии венозный доступ в непрерывном режиме. При отсутствии тенденции к уменьшению количества отделяемого по дренажу на фоне проводимой терапии в течение 10–14 дней рассматривался вопрос о назначении иммуносупрессивной терапии сиролимусом. Решение о назначении препарата по жизненным показаниям принималось врачебным консилиумом на основании рекомендаций Международного общества по изучению сосудистых мальформаций (ISSVA). Родители детей подписывали информированное добровольное согласие на применение препарата "off-label". Критериями для назначения препарата в такой ситуации являются наличие жизнеугрожающего состояния, отсутствие специфического лечения, научные данные, анализ которых позволяет предположить положительный эффект от назначения препарата. В целях профилактики инфекционных осложнений (пневмоцистной инфекции) детям назначалась противомикробная терапия препаратом ко-тримоксазол (сульфаметоксазол + триметоприм) – 36 мг/кг/сут в 2 приема 3 раза/нед на все время проводимой иммуносупрессивной терапии. Препарат сиролимус стартово назначался в минимальной дозировке 0,05 мг (суспензия 1 мг/мл) 2 раза в день с интервалом 12 ч вне зависимости от массы тела ребенка с последующей коррекцией дозировки по результатам исследования концентрации сиролимуса в крови, терапевтическим коридором концентрации считались показатели 8–14 нг/мл. Исследования концентрации проводились на 10–14-е сутки от начала терапии и далее каждые 2 нед в стационаре, на амбулаторном этапе –

1 раз/мес в течение всего курса лечения. При получении концентрации препарата в плазме крови выше должностного значения и невозможности уменьшения дозировки препарата проводилось разведение действующего вещества в большем объеме жидкости, что способствовало возвращению концентрации сиролимуса в принятый терапевтический коридор.

Терапия сиролимусом проводилась под перидическим контролем общего и биохимического анализов крови, гемостазиограммы, УЗИ органов брюшной полости. Регулярное определение концентрации препарата в сыворотке крови проводилось 1 раз/мес, так как в силу активного роста и увеличения массы тела ребенка требуется коррекция дозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ниже кратко изложены данные по каждому клиническому случаю, включенному в наше исследование. Распределение пациентов по сроку гестации,

возрасту, массе тела, количеству отделяемого по дренажу, срокам назначения терапии и длительности курсов октреотида и сиролимуса представлено в *таблице 1*. Следует отметить, что консервативное лечение оказалось эффективным во всех случаях. Терапия октреотидом была эффективна в 5 случаях. Нежелательных реакций и осложнений при этом не отмечено. Назначенная при отсутствии положительной динамики иммуносупрессивная терапия дала положительный результат во всех наблюдениях ($n = 4$), однако в 1 случае при проведении лечения рапамицином потребовалась отмена препарата через 8 нед в связи с развитием осложнений (артрит коленных суставов), угнетением белого ростка крови, концентрация препарата в плазме крови на тот момент составляла 8 нг/мл, что соответствует принятому терапевтическому коридору. На фоне отмены препарата, проведения антимикробной и противогрибковой терапии удалось полностью разрешить явления артрита, движения в коленных суставах

Таблица 1

Распределение пациентов по сроку гестации, возрасту, массе тела, количеству отделяемого по дренажу, срокам назначения терапии и длительности курсов октреотида и сиролимуса

Table 1

Patient distribution by gestational age, age, body weight, volume of drainage fluid, time of treatment initiation and the duration of treatment with octreotide and sirolimus

Параметр Parameter	Пациенты Patients								
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9
Срок гестации, нед Gestational age, weeks	34	33	35	37	36	28,5	38,5	39	37
Масса при рождении, г Body weight at birth, g	2050	1982	2900	2490	2430	800	2970	3190	2600
Масса при поступлении, г Body weight at admission, g	5400	2470	3500	2870	2340	2280	3870	6415	3730
Диагноз Diagnosis	ХП ChP	ХП ChP	ХП ChP	ХП ChP	ХТ ChT	ХТ ChT	ХП ChP	ХП ChP	ХП ChP
Максимальное количество отделяемого по дренажу, мл/сут Maximum volume of drainage fluid, ml/day	600	150	260	600	40	30	100	50	350
Возраст на момент начала терапии октреотидом, дни Age at the time of octreotide treatment initiation, days	122	35	42	10	4	127	35	162	134
Дозировка октреотида, мкг/кг/ч Dose of octreotide, µg/kg/h	10	10	10	10	5	10	10	10	10
Длительность курса октреотида, дни Duration of treatment with octreotide, days	18	10	10	14	10	10	12	14	10
Эффект Outcome	–	+	+	–	+	+	–	+	–
Возраст на момент начала терапии сиролимусом, дни Age at the time of sirolimus treatment initiation, days	140			24			53		144
Дозировка сиролимуса, мг/сут (мг/м ² /сут) Dose of sirolimus, mg/day (mg/m ² /day)	0,2 (0,9)			0,1 (0,9) с увеличением до 0,2 (1,7) 0,1 (0,9) with a subsequent increase to 0,2 (1,7)			0,1 (0,7)		0,1 (0,7), с 14-х суток 0,05 (0,3) 0,1 (0,7); 0,05 (0,3) starting from Day 14
Отсутствие лимфорей от начала терапии сиролимусом, дни The absence of lymphorrhea since the start of treatment with sirolimus, days	12			13			14		8
Длительность курса, нед Duration of treatment, weeks	16			8*			8		8

Примечание. * – отмена в связи с развитием осложнений иммуносупрессивной терапии.

Notes. * – discontinuation due to immunosuppressive therapy-related complications. ChP – chyloperitoneum; ChT – chylothorax.

восстановлены в полном объеме. Повторного накопления жидкости в брюшной полости не выявлено.

Был выполнен биохимический и цитологический анализ дренажной жидкости пациентов, включенных в исследование, данные представлены в *таблице 2*.

В *таблице 3* приведена оценка белковых потерь и их коррекция.

Пациент №1

Диагноз: ХП. Тяжелая белково-энергетическая недостаточность. Недоношенность 34 недели.

В хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России поступил в возрасте 4 месяцев, в течение всего времени до госпитализации обращало на себя внимание постепенное увеличение в объеме живота, по месту жительства обследование и лечение не проводилось. При поступлении ребенку диагностирован асцит, выполнено дренирование брюшной полости, получено около 600 мл хилезной жидкости. Переведен на полное парентеральное питание, назначен октреотид, на фоне проводимой в течение 10 дней терапии сохранялась выраженная лимфоррея без тенденции к уменьшению. По жизненным показаниям принято

решение о введении в брюшную полость 1% водного раствора неполной серебряной соли полиакриловой кислоты с интегрированными наночастицами серебра (5 введений через день). Данный препарат зарегистрирован на территории Российской Федерации и разрешен к применению в детском возрасте. Назначение основывалось на опыте использования данного препарата у детей с лимфатическими мальформациями [14]. Лимфорею купировать не удалось, в связи с чем решением врачебной комиссии назначена терапия сиролimusом. На фоне проводимой терапии отмечается постепенное снижение количества отделяемого по дренажу, на 12-е сутки отделяемого нет, дренаж удален на 14-е сутки. Выписан в удовлетворительном состоянии. Рецидивов не отмечалось.

Пациент №2

Диагноз: ХП. Атрезия пищевода с дистальным трахеопищеводным свищем. Атрезия 12-перстной кишки, ануса, бессвищевая форма. Недоношенность 33 недели.

У ребенка пренатально выявлено наличие кишечной непроходимости. На 1-е сутки поступил в хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»

Таблица 2
Биохимический и цитологический состав дренажной жидкости

Table 2
Biochemical and cytological composition of the patients' drainage fluid

Пациенты Patients	Цитоз, × 10 ⁹ /л Cytosis, × 10 ⁹ /L	Лимфоциты, % Lymphocytes, %	Общий белок, г/л Total protein, g/L	Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L
№1	8,4	96	10,58	0,25
№2	11,7	95	33,9	37,88
№3	6,9	83,2	24,36	0,19
№4	4,952	89,4	29,81	0,63
№5	0,6	87	26,71	0,03
№6	0,108	78,6	4,1	1,94
№7	19,8	88,7	31,23	9,1
№8	1,126	65,9	31,68	5,97
№9	13,1	65,2	27,03	17,55

Таблица 3
Оценка белковых потерь, коррекция

Table 3
The evaluation of protein loss, management

Пациенты Patients	Минимальный показатель общего белка (норма 51–73 г/л), г/л Minimum total protein level (normal range: 51–73 g/L), g/L	Минимальный показатель альбумина (норма 26–43 г/л), г/л Minimum albumin level (normal range: 26–43 g/L), g/L	Минимальный показатель иммуноглобулина G (норма 2,32–14,11 г/л), г/л Minimum immunoglobulin G level (normal range: 2.32–14.11 g/L), g/L	Количество трансфузий препаратов альбумина The number of albumin infusions	Количество трансфузий препаратов иммуноглобулина The number of immunoglobulin infusions
№1	28,32	16,36	0,82	9	5
№2	33,9	24,7	1,82	–	–
№3	32,21	21,84	2,27	2	–
№4	19,95	11,3	0,92	8	5
№5	36,76	24,34	4,02	3	–
№6	38,32	22,71	0,53	2	–
№7	45,91	27,25	2,65	–	–
№8	31,68	24,47	2,54	–	–
№9	42,51	26,16	1,21	1	3

Минздрава России, выполнены оперативные вмешательства: наложение дуоденодуоденоанастомоза, выведение колостомы, торакоскопическая перевязка дистального трахеопищеводного свища, гастростомия, эзофагостомия. В возрасте 1 месяца на фоне активного расширения энтеральной нагрузки отмечено вздутие живота, по УЗИ визуализирована свободная жидкость в брюшной полости и полости малого таза. Выполнена пункция, одномоментно получено около 150 мл хилезной жидкости. Ребенку назначено парентеральное питание, терапия октреотидом с положительным эффектом. Дренаж удален на 13-е сутки. Учитывая наличие множественных врожденных пороков развития, в дальнейшем ребенок неоднократно оперирован, рецидивов ХП не выявлено.

Пациент №3

Диагноз: ХП. Атрезия тощей кишки. Незавершенный поворот кишечника. Недоношенность 35 недель.

После рождения у ребенка отмечались признаки кишечной непроходимости. В возрасте 1 суток жизни проведена резекция мембраны тощей кишки. В дальнейшем в связи с сохраняющимися явлениями частичной кишечной непроходимости ребенок поступил в хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, выполнена релапаротомия, наложение обуживающего пликационного межкишечного анастомоза по de Lorigier–Harrison. В послеоперационном периоде на фоне возобновления грудного вскармливания отмечено увеличение в объеме живота, УЗИ выявило большое количество свободной жидкости в брюшной полости, выполнены пункция и дренирование брюшной полости. Одномоментно получено около 260 мл хилезного отделяемого. Назначено полное парентеральное питание, терапия октреотидом с положительной динамикой. Через 5 дней от момента начала терапии возобновлена энтеральная нагрузка, дренаж удален на 8-е сутки. Ребенок выписан в удовлетворительном состоянии.

Пациент №4

Диагноз: ХП. Омфалоцеле больших размеров. Врожденный порок сердца (ВПС): дефект межжелудочковой перегородки, вторичный дефект межпредсердной перегородки. Легочная гипертензия: недостаточность кровообращения (НК) 2А, функциональный класс (ФК) III по Ross. Недоношенность 36 недель.

Сразу после рождения ребенок переведен в хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»

Минздрава России, выполнены удаление эмбриональных оболочек, разделение эмбриональных спаек, первичная радикальная пластика передней брюшной стенки с формированием неопупка. На фоне начала энтеральной нагрузки отмечено выраженное увеличение размеров живота. При проведении УЗИ выявлено большое количество свободной жидкости в брюшной полости. При дренировании брюшной полости получено 400 мл хилезной жидкости. Начата консервативная терапия: полное парентеральное питание, октреотид. В течение 14 дней положительной динамики не отмечалось, принято решение о назначении сиролимуса. Явления лимфореи полностью купированы на 13-е сутки на фоне терапии сиролимусом. Ребенок выписан в удовлетворительном состоянии. Общая продолжительность курса составила 8 нед. Терапия препаратом сиролимус была отменена в связи с развитием инфекционных осложнений (артрит правого и левого коленных суставов), угнетением белого ростка крови. Концентрация сиролимуса в плазме крови на момент развития осложнений составляла 8 нг/мл. На фоне отмены препарата сиролимус, проведения антимикробной и противогрибковой терапии удалось полностью разрешить явления артрита, движения в коленных суставах восстановлены в полном объеме. При проведении контрольного УЗИ органов брюшной полости накопления свободной жидкости не отмечалось.

Пациент №5

Диагноз: ХТ. Атрезия пищевода с дистальным трахеопищеводным свищем. ВПС: правосформированное праворасположенное сердце. Подковообразная почка, каликопиелозктазия левого сегмента. Краниосиностоз. Недоношенность 36 недель.

В возрасте 2 суток жизни ребенок поступил в хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Оперирован на 5-е сутки жизни – торакоскопия, перевязка трахеопищеводного свища, наложение эзофагоэзофагоанастомоза. На 4-е послеоперационные сутки выявлены признаки ХТ. Назначена терапия октреотидом с положительной динамикой, полное парентеральное питание. Через 5 сут после начала терапии явления лимфореи купированы. Дренаж удален на 11-е послеоперационные сутки. При проведении дальнейшего обследования и лечения ребенка рецидивов не отмечалось.

Пациент №6

Диагноз: ХТ. Гидроперикард. Носитель илеостомы. Недоношенность 28 недель.

На 12-е сутки жизни в связи с явлениями кишечной непроходимости проведена лапаротомия, выведение двойной илеостомы. В возрасте 2 месяцев

4 дней ребенок поступил в хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, выполнены лапаротомия, ревизия органов брюшной полости, устранение спаечной непроходимости, реконструкция стомы. В возрасте 4 месяцев поступил в хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, проведено закрытие илеостомы, наложение межкишечного анастомоза. На 2-е послеоперационные сутки у ребенка отмечено ухудшение состояния, выявлены признаки гидроперикарда и гидроторакса, произведена пункция плевральной полости, получено около 30 мл хилезной жидкости. Назначена консервативная терапия: энтеральная пауза, октреотид. Состояние с положительной динамикой. Плевральный дренаж удален на 5-е сутки, терапия октреотидом отменена, рецидивов не наблюдалось.

Пациент №7

Диагноз: ХП. Атрезия пищевода с дистальным и проксимальным дистальным трахеопищеводным свищем. Агенезия желчного пузыря. ВПС: дефект межжелудочковой перегородки, частичный аномальный дренаж легочных вен, НК 2А.

По месту жительства у ребенка выявлена атрезия пищевода, проведено экстренное оперативное вмешательство – правосторонняя заднебоковая торакотомия, перевязка трахеопищеводного свища, пластика пищевода «конец в конец», дренирование заднего средостения. В послеоперационном периоде после начала энтеральной нагрузки отмечалось ухудшение состояния, в связи с подозрением на несостоятельность анастомоза выполнено повторное оперативное вмешательство – гастростомия, фундопликация, интраоперационно выявлено наличие 200 мл выпота в брюшной полости. В дальнейшем отмечалось нарастание объема свободной жидкости в брюшной полости по данным УЗИ. Выполнено дренирование брюшной полости. Назначены парентеральное питание, консервативная терапия октреотидом, на этом фоне отмечена положительная динамика, уменьшение количества отделяемого по дренажу, но после повторного оперативного вмешательства – перевязки проксимального трахеопищеводного свища, реконструкции фундопликационной манжеты, гастростомии – при возобновлении энтерального кормления выявлен рецидив ХП. Назначена иммуносупрессивная терапия сиролимусом, на 14-е сутки от начала лечения отделяемого по дренажу нет. В дальнейшем рецидивов не было.

Пациент №8

Диагноз: ХП. Лимфангиома брыжейки тонкой кишки.

В возрасте 1 месяца при проведении УЗИ по месту жительства выявлено наличие многокамерного жидкостного объемного образования в брюшной полости. Выполнена диагностическая лапароскопия, выявлено наличие протяженного поражения брыжейки, множественные кисты до 3–4 см в диаметре, содержащие хилезную жидкость. В возрасте 5 месяцев в хирургическом отделении новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России выполнено оперативное вмешательство: удаление лимфангиомы брыжейки тонкой кишки, наложение энтероэнтероанастомоза. В послеоперационном периоде на фоне возобновления энтеральной нагрузки отмечено появление отделяемого хилезного характера по дренажу из брюшной полости. Энтеральная нагрузка отменена, назначен октреотид, на этом фоне отмечается уменьшение количества отделяемого из брюшной полости, дренаж удален на 9-е сутки от момента начала терапии. Ребенок выписан в удовлетворительном состоянии.

Пациент №9

Диагноз: ХП. Синдром Дауна, мембрана 12-перстной кишки. ВПС: дефект межжелудочковой перегородки, добавочная верхняя полая вена в коронарный синус.

В возрасте 2 месяцев госпитализирован по месту жительства с явлениями высокой кишечной непроходимости, которые купированы консервативно. В возрасте 2 месяцев выполнена перевязка открытого артериального протока, операция Muller, суживание легочной артерии, НК 2А. В возрасте 4 месяцев госпитализирован в экстренном порядке с явлениями высокой кишечной непроходимости по месту жительства, переведен в хирургическое отделение новорожденных и детей грудного возраста ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Выполнено оперативное вмешательство: лапаротомия, дуоденодуоденоанастомоз по Kimura, операция при незавершенном повороте кишечника. В послеоперационном периоде на фоне возобновления энтеральной нагрузки отмечено накопление жидкости в брюшной полости по данным УЗИ, выполнены пункция и дренирование брюшной полости, получено 350 мл жидкости хилезного характера. Ребенок переведен на полное парентеральное питание. Назначен октреотид. Терапия в течение 10 дней без эффекта. Решением врачебной комиссии назначен иммуносупрессивный препарат сиролимус. Дренаж удален на 8-е сутки. Выписан в удовлетворительном состоянии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В проведенном исследовании все дети имели хирургическую патологию, что подтверждает соче-

тание пороков развития лимфатической системы с другими пороками развития, в частности требующими хирургического вмешательства.

Данные исследований об эффективности лечения октреотидом весьма противоречивы, но в настоящий момент этот метод является наиболее часто применяемым и максимально безопасным, поэтому все дети в нашем исследовании стартово получали терапию октреотидом и лишь при отсутствии улучшения клинической картины рассматривался вопрос о назначении иммуносупрессивной терапии. В большинстве литературных источников терапия октреотидом считалась несостоятельной после нескольких недель применения, по нашему мнению, этот срок должен быть сокращен и при отсутствии тенденции к снижению количества отделяемого по дренажу в течение 7–10 дней следует рассматривать вопрос об изменении тактики лечения. Длительная выжидательная тактика в этом случае не имеет смысла, поскольку даже не очень значительное количество отделяемого по дренажу для ребенка раннего возраста неизбежно ведет к потерям белка, жидкости, электролитов, нарушениям свертывающей системы крови и иммунитета.

Сроки получения эффекта от терапии октреотидом в нашем исследовании сопоставимы с литературными данными и составляли от 10 до 14 дней, в среднем 11 дней.

По нашим наблюдениям средняя продолжительность терапии сиролимузом до получения эффекта в виде отсутствия лимфорей составила 12 дней, это меньше, чем в аналогичных исследованиях иностранных авторов. Длительность курса в нашем исследовании составила от 8 до 16 нед, в аналогичном зарубежном исследовании – от 2 до 22 нед [8]. Ни в одном литературном источнике нам не встретилось рекомендаций по длительности курса иммуносупрессивной терапии, критерии возможности отмены терапии также не описаны. Эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

В зарубежных исследованиях есть данные о более высоких и субтерапевтических concentra-

циях, которые оказались эффективными [8], точный коридор пока не определен, в настоящий момент концентрация эмпирически экстраполирована с лечения пороков развития лимфатической системы, хотя, возможно, и более низкая концентрация будет также эффективна, поэтому в будущих исследованиях необходим контроль концентрации сиролимуза через равные промежутки времени в целях более точного определения терапевтического коридора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование показывает, что терапия сиролимузом оказывается эффективной в сложных случаях ХП и ХТ у детей даже в периоде новорожденности. В связи с редкостью данной патологии вывод основан на небольшой серии случаев. Для подтверждения сделанных нами выводов, выработки общепринятого протокола диагностики и лечения не хватает целенаправленных многоцентровых исследований. До разработки клинических рекомендаций по терапии ХП и ХТ назначение иммуносупрессивной терапии следует рассматривать индивидуально и по решению внутренней врачебной комиссии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Gurskaya A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8663-2698>

Sulavko M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-6295>

Bayazitov R.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2809-1894>

Karnuta I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1707-102X>

Ekimovskaya E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5098-2266>

Nakovkin O.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5320-837X>

Akhmedova D.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0902-7205>

Klepikova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-7418-0837>

Khagurov R.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7944-8438>

Petrova N.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3161-5177>

Skvortsova V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6521-0936>

Литература

1. Кучеров Ю.И., Яшина Е.В., Жиркова Ю.В., Чеботаева Л.И., Москвитина Л.Н. Лечение новорожденного с хилотораксом, хилоперикардом и хилоперитонеумом. *Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии* 2016; 6 (1): 95–9.
2. Albaghdady A., El-Asmar K.M., Moussa M., Abdelhay S. Surgical management of congenital chylous ascites. *An Pediatr Surg* 2018; 14 (2): 56–9. DOI: 10.1097/01.XPS.0000525972.33509.05
3. Рудакова Э.А., Ковалева О.А., Опеньшева А.В., Королева М.А. Результаты лечения хилоперитонеума у новорожденного. *Пермский медицинский журнал* 2015; 32 (6): 78–83.
4. Кучеров Ю.И., Холоднова Н.В., Адлейба С.Р., Белая А.Л., Макарова Л.М., Овсянникова М.А. и др. Хилоперитонеум у новорожденных: этиология, патогенез, диагностика и лечение. *Детская хирургия* 2019; 23 (3): 139–42. DOI:10.18821/1560-9510-2019-23-3-139-142
5. Karaca S., Gemayel G., Kalangos A. Somatostatin treatment of a persistent chyloperitoneum following abdominal aortic Surgery. *J Vasc Surg* 2012; 56 (5): 1409–12. DOI:10.1016/j.jvs.2012.05.004
6. Ilaria A., Mariarosa C., Genny R., Giacomo C., Fabrizio C., Silvana G., et al. The use of sirolimus in the treatment of giant cystic lymphangioma: Four case reports and update of medical therapy. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96 (51): e8871. DOI: 10.1097/MD.0000000000008871
7. Донюш Е.К., Кондрашова З.А., Поляев Ю.А., Гарбузов Р.В. Опыт использования сиролимуса в лечении детей с сосудистыми аномалиями. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2020; 7 (3): 22–31. DOI: 10.21682/2311-1267-2020-7-3-22-31
8. Киреева Н.Б., Пивиков В.Е., Новопольцев Е.А., Тумаков Н.Б., Плехарский Н.А., Бирюков Ю.П. и др. Хилоторакс и хилоперитонеум у новорожденных: сообщение о четырех случаях. *Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии* 2016; 6 (4): 88–90.
9. Agarwal S., Anderson V.K., Mahajan P., Fernandes C.J., Margolin J.F., Iacobas I. Sirolimus efficacy in the treatment of critically ill infants with congenital primary chylous effusions. *Pediatr Blood Cancer* 2022; 69: e29510. DOI:10.1002/pbc.29510
10. Roehr Charles C., Jung A., Proquitté H., Blankenstein O., Hammer H., Lakhoo K., et al. Somatostatin or octreotide as treatment options for chylothorax in young children: a systematic review. *Intensive Care Med* 2006; 32 (5): 650–7. DOI: 10.1007/s00134-006-0114-9
11. Reck-Burneo C.A., Parekh A., Velcek F.T. Is octreotide a risk factor in necrotizing enterocolitis? *J Pediatr Surg* 2008; 43: 1209–10. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2008.02.062
12. Antao B., Croaker D., Squire R. Successful management of congenital chyloperitoneum with fibrin glue. *J Pediatr Surg* 2003; 38 (11): E7–8. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2003.08.011
13. Parkhitko A.A., Favorova O.O., Khabibullin D.I., Anisimov V.N., Henske E.P. Kinase mTOR: regulation and role in maintenance of cellular homeostasis, tumor development, and aging. *Biochemistry (Mosc)* 2014; 79 (2): 128–43. DOI: 10.1134/S0006297914020023
14. Сафин Д.А., Романов Д.В. Использование препарата «Гемоблок» в склерозировании сосудистых мальформаций. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2019; 98 (6): 201–6.

Assessment of erythroferrone levels in children with chronic kidney disease on regular hemodialysis

Mahmoud Ahmed El-Hawy¹, Ahmed Adel Mahmoud Nowir¹,
Shimaa Abdelsatar Refat Zaki², Mohamed Shokry El-Haruon¹

¹Menoufia University, Menoufia, Egypt

²National Liver Institute, Menoufia University, Menoufia, Egypt

Correspondence:

Mahmoud Ahmed El-Hawy,
Department of Pediatrics,
Faculty of Medicine, Menoufia University,
Shebin El Kom, Egypt
Address: Shebin El Kom,
32511 Menoufia, Egypt
E-mail: mahmodelhawy18@yahoo.com

Anemia is a common comorbidity in children with chronic kidney disease (CKD) and is associated with adverse outcomes. Erythroferrone (ERFE) is a hepcidin inhibitor whose synthesis is stimulated by erythropoietin, which increases iron absorption and mobilization. Aim of the study: to assess the levels of ERFE hormone in children with CKD on regular hemodialysis. This case-control study was carried out at Menoufia University Hospital and included 70 subjects: 38 healthy individuals (controls) and 32 children with CKD on regular dialysis (cases). The study was approved by the Faculty of Medicine Ethics Committee at Menoufia University. All children were subjected to full history taking, complete clinical examination, blood tests such as complete blood count, reticulocyte count, serum iron, ferritin, and total iron binding capacity, liver and renal function tests, and an immunoassay to measure human ERFE. There was a statistically significant difference in the levels of ERFE between the cases and controls ($p < 0.001$). There was a significant, strong correlation between the levels of hemoglobin and serum iron and the level of ERFE ($r = -0.655$, $p < 0.001$). There was no significant correlation between the administered dose of exogenous erythropoietin and the level of ERFE ($p = 0.460$). Serum ERFE levels in the children with CKD on regular hemodialysis were significantly higher than in the controls and were negatively correlated with hemoglobin and iron levels. There was no significant correlation between ERFE levels and both serum ferritin and total iron binding capacity levels.

Key words: anemia, chronic kidney disease, erythroferrone, hemodialysis

Mahmoud Ahmed El-Hawy, et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 130–5.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-130-135

Iron plays a crucial role in several fundamental biological processes such as oxygen transport, cellular respiration, and metabolic reactions [1]. A complex system of proteins and hormones controls iron metabolism, and hepcidin is a major regulator of this system [2].

Hepcidin reduces the intestinal absorption of dietary iron and the release of stored iron from hepatocytes and macrophages, a process involving the cellular iron exporter ferroportin. Iron and inflammation are both hepcidin enhancers, while hypoxia-inducible factors, the sex hormones estrogen and testosterone, downregulate hepcidin [2].

In 2014, a new iron metabolism regulating factor synthesized in erythroblasts in response to erythropoietin (EPO) – erythroferrone (ERFE) – was identified [3].

ERFE hormone is encoded by the *FAM132B* gene – now renamed *ERFE* gene – and coincides with a protein also expressed in the skeletal muscle, called myonectin (CTRP15) [4].

By suppressing hepcidin, ERFE increases the absorption and mobilization of iron to provide an adequate iron supply during stress erythropoiesis such as during rapid growth or blood loss [3].

Anemia is a hallmark of chronic kidney disease (CKD) [5] and EPO deficiency and reduced iron bioavailability by high hepcidin levels are fundamental factors underlying this condition in CKD [6].

ERFE production is stimulated by endogenous or exogenous EPO, thus serving to couple increased erythropoietic activity with decreased hepcidin, allowing for maintenance of plasma iron concentrations in the setting of increased erythropoiesis-associated iron demand [3].

As ERFE is a newly discovered hormone, there is a limited number of studies investigating ERFE levels. Our study aimed to assess the levels of ERFE hormone in children with CKD undergoing regular hemodialysis at Pediatric Nephrology Unit, Menoufia University Hospital.

MATERIALS AND METHODS

This study is a case-control study conducted at Menoufia University Hospital from July 2021 till January 2022 among children aged 3–18 years old with CKD undergoing regular hemodialysis and exogenous EPO treatment and healthy controls. The study was approved by the Faculty of Medicine Ethics Committee

at Menoufia University. Informed consent from the participants' parents was obtained verbally and the confidentiality of information was assured.

The study subjects were allocated into two groups. Group 1 (cases) consisted of 32 children with CKD undergoing regular hemodialysis who attended the Department of Pediatrics of Menoufia University Hospital. Group 2 (controls) consisted of 38 healthy children that were randomly selected from the Department of Pediatrics of Menoufia University Hospital. Patients under 3 years old or over 18 years old and those without parental consent were excluded from our study.

All the patients were subjected to full history taking (age, sex, the presence of parental consanguinity, age at diabetes onset, a family history, comorbidities, a medication history, the duration of hemodialysis. The duration of dialysis and dialysis doses (calculated by the number of dialysis sessions per week \times dialysis hours; dialysis doses) were also assessed. The efficiency of hemodialysis was evaluated by measuring the urea reduction rate. We also collected data on the onset of anemia, the intake of iron supplements, a history of fatigue, poor activity, exertion, dyspnea, breathlessness at rest, blood transfusions in the past, diabetes mellitus (type – duration – treatment – controlled or not – presence of other diabetic complications), and hypertension (duration – controlled or not).

A complete clinical examination included the evaluation of general appearance, body measurements (weight and height), measurements of blood pressure and other vital signs such as temperature, heart rate, respiratory rate. We also performed chest, cardiovascular (CV), abdominal, and neurological examination.

Laboratory examinations included complete blood count, reticulocyte count, serum iron, ferritin and total iron binding capacity (TIBC), liver and renal function tests and human ERFE assay (a sandwich enzyme immunoassay).

Statistical analysis

Data analysis was performed using Statistical Program for Social Science version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative variables were described in the form of mean and standard deviation. Qualitative variables were described as number and percent. Student's t-test was performed to compare parametric quantitative variables between two groups. Qualitative variables were compared using chi-square test or Fisher's exact test when frequencies were < 5 . Pearson's correlation coefficients were employed to assess the association between two normally distributed variables. When a variable was not

normally distributed, a p -value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

There was a significant difference in the level of ERFE between the cases and controls ($p < 0.001$) (table 1).

There was a significant strong correlation between the levels of hemoglobin and ERFE ($r = -0.655$, $p < 0.001$) (table 2).

There was a strong correlation between the levels of ERFE and serum iron ($r = -0.906$, $p < 0.001$) (table 3).

There was no significant correlation between the administered dose of exogenous EPO and the level of ERFE ($p = 0.460$) (table 4).

There was no significant impact of age, sex and body mass index (BMI) on the level of ERFE ($p = 0.28$, $p = 0.71$ and $p = 0.235$, respectively). The level of ERFE changed significantly by the change in the serum iron when adjusting the age, sex and the dose of the exogenous ERFE ($p = < 0.001$) (table 5).

DISCUSSION

Management guidelines for anemia in pediatric CKD patients have been developed from reported studies

Table 1

A comparison of the groups by the level of ERFE

Level of ERFE	Cases (n = 32)	Controls (n = 38)	p
Range	9.85 – 27.25	4.75 – 14.45	< 0.001*
Mean \pm SD	17.37 \pm 4.53	10.26 \pm 2.05	

Note. SD – standard deviation; p – p-value for the difference in the levels of ERFE between the two groups; * – statistically significant at $p \leq 0.05$.

Table 2

A correlation between the levels of ERFE and hemoglobin (g/dL)

Hemoglobin	Level of ERFE, ng/mL	
	r	p
Total sample	-0.655	< 0.001*
Cases	-0.019	< 0.042*
Controls	-0.909	< 0.001*

Note. Here and in tables 3, 4: r – the Pearson coefficient; * – statistically significant at $p \leq 0.05$.

Table 3

A correlation between the level of ERFE and different parameters in the group of cases (n = 32)

Parameter	Level of ERFE (ng/mL)	
	r	p
Serum iron, mg/dL	-0.906	< 0.001*
Serum ferritin, ng/mL	-0.074	0.687
TIBC, mg/L	-0.288	0.110

Table 4

A correlation between the level of ERFE and the dose of exogenous EPO (IU/week) in the group of cases (n = 32)

Parameter	Level of ERFE (ng/mL)	
	r	p
Dose of exogenous EPO, IU/week	-0.135	0.460

Table 5
Univariate and multivariate linear regression analysis for the parameters affecting the level of ERFE (ng/mL) in the group of cases ($n = 32$)

Parameter	Univariate		Multivariate [#]	
	<i>p</i>	B (95% CI)	<i>p</i>	B (95% CI)
Sex	0.710	-0.629 (-4.058-2.799)		
Age, years	0.280	0.252 (-0.216-0.720)		
Complication: vomiting dehydration edema gastroenteritis polyuria enuresis	0.067 0.024* 0.801 0.468 0.364 0.226	3.746 (-0.282-7.773) 4.305 (0.614-7.995) 0.571 (-4.006-5.148) -1.520 (-5.745-2.704) -2.039 (-6.558-2.479) -3.367 (-8.935-2.200)	0.057	1.648 (-0.053-3.350)
Consanguinity of parents	0.410	-1.344 (-4.634-1.945)		
Echo	0.260	1.571 (-1.222-4.364)		
Height [7]	0.123	0.088 (-0.025-0.201)		
Weight [8]	0.541	0.037 (-0.084-0.157)		
BMI, kg/m ²	0.235	0.317 (-0.218-0.853)		
Hemoglobin, g/dL	0.918	-0.078 (-1.616-1.459)		
Calcium, mg/dL	0.450	0.736 (-1.225-2.697)		
PO ₄ , mg/dL	0.764	0.172 (-0.988-1.332)		
PTH, mg/dL	0.122	-0.003 (-0.008-0.001)		
Serum iron, mg/dL	< 0.001*	-0.213 (-0.250 - (-0.176))	< 0.001*	-0.203 (-0.240 - (-0.166))
Serum ferritin, ng/mL	0.687	-0.005 (-0.032-0.021)		
TIBC, mg/L	0.110	-0.002 (-0.004-0.0)		
Pulse	0.814	0.042 (-0.318-0.4020)		
Dose of exogenous EPO, IU/week	0.460	0.0 (0.0-0.0)		

Note. B – unstandardized coefficients; CI – confidence interval; [#] – all variables with $p < 0.05$ were included in the multivariate analysis; * – statistically significant at $p \leq 0.05$.

in both adults and children, from clinical experience and from expert opinion. The revised National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for the management of anemia specifically for children have been recently published [13].

Biomarkers of iron metabolism like serum ferritin and hepcidin have been independently associated with the risk of death and CV events in this CKD patients [11].

In our study, there was no significant difference in the age or sex distribution between the controls and the CKD patients on regular hemodialysis ($p = 0.775$ and $p = 0.313$, respectively). In agreement with our results, Ogawa et al. [14] reported that there was no significant difference between the studied groups as regards age (years) and sex. In contrast to our results, Astor et al. [5] reported a statistically significant difference between the studied groups as regards age (years) and sex. In the study by Yu et al. [15], there was a highly statistically significant difference between the studied groups as regards age (years) and sex, which also disagrees with our results.

Our study showed a statistically significant difference in hemoglobin levels between the cases and controls ($p < 0.001$). The mean level of hemoglobin was 10.37 g/dL in the group of cases and 12.45 g/dL in the group of controls. In agreement with our results, Yu et al. [15] reported a highly statistically significant

difference in the levels of hemoglobin between the studied groups ($p > 0.001$). In the study by Ogawa et al. [14], there also was a statistically significant difference in the levels of hemoglobin between the studied groups ($p = 0.006$). Hanudel et al. [16] showed that the mean hemoglobin level (g/dL) in non-dialysis CKD patients was 12.1 ± 1.7 SD, while in dialysis-dependent CKD patients it was 11.9 ± 1.5 SD.

In our study, there was a statistically significant difference in the levels of ERFE between the cases and the controls ($p < 0.001$). The mean ERFE levels were 17.37 ng/mL and 10.26 ng/mL in the groups of cases and healthy controls, respectively.

In the first study investigating ERFE in CKD patients, serum ERFE levels in hemodialysis patients were substantially similar to those in control subjects and 10 times lower than the levels in hemodialysis patients in the study by Spoto et al. [11] (0.5 ng/mL vs. 4.5 ng/mL). In the second study by Hanudel et al. [16], serum ERFE levels, measured by the recent assay by Ganz et al., were similar in 51 CKD and 161 healthy control subjects (6.1 (2.6–15.0) ng/mL and 7.8 (4.7–13.2) ng/mL, respectively) but twice lower than in 97 hemodialysis patients (15.7 (7.9–32.5) ng/mL).

Spoto et al. reported that ERFE emerged as a coherent direct risk factor of death and CV complications in two separate CKD cohorts. ERFE is strongly related in an inverse fashion to hepcidin in hemodialysis patients, which is a direct

correlate of CV events in such patients. In our study, echocardiographic examination showed that 12 (37.5%) cases had normal findings, 18 (56.3%) cases had left ventricular hypertrophy, and only 2 (6.3%) cases had cardiomyopathy.

Spoto et al. reported that the relationship between ERFE and the study outcomes was largely independent of major inflammation markers like C-reactive protein, serum iron, and ferritin, suggesting that interference with these factors does not explain the excess risk for death and CV events by relatively higher levels of ERFE in CKD and in hemodialysis patients. It is important to note that ERFE synthesized in the skeletal muscle in response to exercise (myonectin) has a protective role for the CV system in experimental models. Even though discrepancies among myonectin and ERFE assays still need to be understood and reconciled, it should be noted that other biomarkers that underlie a protective action for the CV system, like adiponectin – a paralogue to ERFE – are directly, rather than inversely, related to the risk of death in hemodialysis patients.

Our study showed a significant strong negative correlation between the levels of hemoglobin and ERFE ($r = -0.655$, $p < 0.001$).

ERFE is known to inhibit the induction of hepcidin. In the study by van Vuren et al., hepcidin values were unavailable, which limited the ability to study the link between erythropoiesis and iron metabolism in their cohort. Hepcidin itself was previously shown to be capable of inducing FGF23 production and its cleavage, independently of inflammation [19, 20].

Van Vuren et al. [20] underscore the importance of EPO-ERFE signaling in hemolytic anemia; however, ERFE is not simply an intermediary in EPO-FGF23 signaling. Their observation is in line with Clinkenbeard et al. [21] study that was performed in mice. Thereby, they confirm the persistence of a relationship between EPO and FGF23 regulation in the absence of iron deficiency.

In our study, we found a significant strong correlation between the levels of ERFE and serum iron ($r = -0.955$, $p < 0.001$). However, there was no significant correlation between the levels of ERFE and serum ferritin ($r = 0.074$, $p < 0.687$) and between the levels of ERFE and TIBC (mg/L) ($r = -0.288$, $p < 0.110$).

Kalantar-Zadeh et al. indicated that low serum TIBC is related to protein-energy wasting, inflammation, poor quality of life, and mortality. They found that TIBC is positively associated with nutritional biomarkers such as serum albumin and negatively associated with several inflammatory markers such as log C-reactive protein [15].

The prevalence of anemia among patients with stage 3–5 CKD was 88.6% in the study by Thang et al. [23]. A similar Chinese cohort including 2420

patients with stage 1–5 CKD reported that 51.5% of patients had anemia, of which 1338 patients had stage 3–5 CKD. A Japanese cohort study showed that 32.3% of 2930 patients with stage 3–5 CKD were diagnosed as anemic. In a South Korean cohort study, 44.9% of 2198 patients with stage 1–5 CKD were diagnosed as anemic (1524 patients with stage 3–5 CKD) [24].

In the United States, the prevalence of anemia in patients with CKD was 15.4% in the NHANES study and 46% in the Chronic Renal Insufficiency Cohort study. [25]. Considering the discrepancy in anemia prevalence, the results obtained by Thang et al might have been higher than the aforementioned studies because 175 patients in their study were diagnosed as having stage 3–5 CKD for the first time (62.3% in stage 5 CKD).

The majority of the patients in that study had mild to moderate anemia. Thang et al found that the prevalence of moderate and severe anemia increased progressively with the deteriorating of renal function. These findings reflect that anemia severity increases with declining renal function, which can be attributed to various factors associated with the development of anemia in patients with CKD, such as EPO insufficiency, iron and vitamin deficiency, malnutrition, inflammation, platelet dysfunction, reduced red blood cell survival, and hemolysis. Most patients in their study had normochromic–normocytic anemia, comparable to the findings of other studies.

In the study by Thang et al. [23], the mean serum iron and ferritin levels and TIBC in patients with CKD were significantly different from the values in the control group. In particular, ferritin levels were significantly higher in the study group (259 ng/mL) than in the control group (160 ng/mL). TIBC was lower in the study group (50.4 $\mu\text{mol/L}$) than in the control group (66.0 $\mu\text{mol/L}$). An increase in ferritin levels can be explained by the nonspecific protein synthesis compensating for protein loss in advanced CKD as well as the progression of inflammation in CKD patients. Since the KDOQI 2006 workgroup recommended targeting serum ferritin levels of more than 100 ng/mL in patients with non-dialysis end-stage renal disease, some randomized control studies showed beneficial that iron treatment had erythropoietic effects in patients with stage 3–5 CKD and ferritin levels exceeding 100 ng/mL. Currently, the Vietnamese Nephrology Association covered the use of intravenous iron in patients with CKD and with transferrin saturation < 20.0% or ferritin < 100 ng/mL, and hemoglobin lower than 10 g/dL [23].

Alzaheb et al. [27] reported that iron deficiency anemia was prevalent among female university students in Saudi Arabia (12.5%) and that inadequate iron intake was a risk factor related to contracting

anemia. One of the most common factors influencing iron homeostasis is inflammation, which is present in CKD, especially in end-stage CKD.

However, Thang et al. also found a relationship between overall iron deficiency and serum hs-C-reactive protein in their study. The proportion of overall iron deficiency increased through stage 3 CKD to stage 5 CKD. The causes of iron deficiency in patients with CKD were multifactorial. Some had true iron deficiency, characterized by a decrease in both circulating iron levels and total body iron stores. Other patients had functional iron deficiency, characterized by a decrease in circulating iron that limits erythropoiesis, which can occur even in the context of normal or adequate body iron stores. A combination of these features was also sometimes presented. Factors predisposing patients with CKD to iron deficiency included increasing blood loss, increased iron utilization from ESA therapy, impaired dietary iron absorption, and impaired iron release from body storage sites.

When evaluating the correlation between TIBC and some para-clinical indices, Thang et al. [23] found that TIBC had a weak negative correlation with creatinine level, a weak positive correlation with hemoglobin concentration, a negative correlation with serum ferritin (ng/mL) and TIBC (mg/L). TIBC depends on the blood's capacity to bind iron with iron-bearing proteins including transferrin. TIBC denotes the quantity of iron transported to the body. TIBC is usually lower in patients with chronic diseases, inflammation, malnutrition, or proteinuria. In patients with CKD,

malnutrition is often a major problem. Malnutrition leads to hypoproteinemia, which causes a decrease in TIBC and hemoglobin concentration. Overall iron deficiency is often characterized by decreased iron and transferrin saturation levels as well as increased ferritin and TIBC concentrations.

Our study has some limitations. First, we did not measure the target molecule of ERFE – hepcidin. Heparin is in the pathogenic pathway whereby ERFE impacts upon iron metabolism and anemia and, ultimately, on clinical outcomes. Another limitation is the small number of patients.

CONCLUSION

Serum ERFE levels in the children with CKD on regular hemodialysis were significantly higher than those in the controls. Serum ERFE levels in the cases were correlated negatively with hemoglobin and iron levels, with no significant correlation between the levels of ERFE and both serum ferritin and TIBC. These observations suggest that ERFE may be a part of the biological response to a high-risk condition like CKD, a hypothesis that remains to be tested in mechanistic studies.

FUNDING

Not specified.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Abbaspour N., Hurrell R., Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 2014; 19 (2): 164.
2. Rishi G., Wallace D.F., Subramaniam V.N. Heparin: regulation of the master iron regulator. *Biosci Rep* 2015; 35 (3): e00192. DOI: 10.1042/BSR20150014
3. Kautz L., Jung G., Valore E.V., Rivella S., Nemeth E., Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014; 46 (7): 678–84.
4. Seldin M.M., Peterson J.M., Byerly M.S., Wei Z., Wong G.W. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem* 2012; 287 (15): 11968–80.
5. Astor B.C., Muntner P., Levin A., Eustace J.A., Coresh J. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988–1994). *Arch Int Med* 2002; 162 (12): 1401–8.
6. Panwar B., Gutiérrez O.M. Disorders of iron metabolism and anemia in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* 2016; 36 (4): 252–61. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2016.05.002
7. Crowson C.S., Rollefstad S., Ikdaahl E., Kitas G.D., Van Riel P.L., Gabriel S.E., et al. Impact of risk factors associated with cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2018; 77 (1): 48–54.
8. Libby P., Buring J.E., Badimon L., Hansson G.K., Deanfield J., Bittencourt M.S., et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5 (1): 56. DOI: 10.1038/s41572-019-0106-z
9. Raichoudhury R., Spinowitz B.S. Treatment of anemia in difficult-to-manage patients with chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2021; 11 (1): 26–34.

10. Atkinson M.A., Warady B.A. Anemia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2018; 33 (2): 227–38.
11. Spoto B., Pizzini P., Torino C., Leonardis D., Cutrupi S., Tripepi G., et al. FP379 Erythroferrone Predicts Mortality and Cardiovascular Events in CKD and in Hemodialysis Patients: A Two Cohorts Study. *Nephrol Dial Transplant* 2019; 34 (Suppl_1): p.gfz106. FP379.
12. Kuriyama S., Maruyama Y., Honda H. A new insight into the treatment of renal anemia with HIF stabilizer. *Renal Replacement Therapy* 2020; 6 (1): 1–14.
13. Allen R.P., Picchiatti D.L., Auerbach M., Cho Y.W., Connor J.R., Earley C.J., et al. Evidence-based and consensus clinical practice guidelines for the iron treatment of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease in adults and children: an IRLSSG task force report. *Sleep Med* 2018; 41: 27–44.
14. Ogawa C., Tsuchiya K., Kanda F., Maeda T. Low levels of serum ferritin lead to adequate hemoglobin levels and good survival in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2014; 40 (6): 561–70.
15. Yu P.-H., Lin M.-Y., Chiu Y.-W., Lee J.-J., Hwang S.-J., Hung C.-C., Chen H.-C. Low serum iron is associated with anemia in CKD stage 1–4 patients with normal transferrin saturations. *Sci Rep* 2021; 11 (1): 1–10.
16. Hanudel M.R., Rappaport M., Chua K., Gabayan V., Qiao B., Jung G., et al. Levels of the erythropoietin-responsive hormone erythroferrone in mice and humans with chronic kidney disease. *Haematologica* 2018; 103 (4): e141.
17. Van der Weerd N.C., Grooteman M.P., Bots M.L., van den Dorpel M.A., den Hoedt C.H., Mazairac A.H., et al. Hepcidin-25 is related to cardiovascular events in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28 (12): 3062–71.
18. Honda H., Kobayashi Y., Onuma S., Shibagaki K., Yuza T., Hirao K., et al. Associations among erythroferrone and biomarkers of erythropoiesis and iron metabolism, and treatment with long-term erythropoiesis-stimulating agents in patients on hemodialysis. *PLoS One* 2016; 11 (3): e0151601.
19. David V., Martin A., Isakova T., Spaulding C., Qi L., Ramirez V., et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int* 2016; 89 (1): 135–46.
20. Van Vuren A.J., Eisenga M.F., van Straaten S., Glenthøj A., Gaillard C.A., Bakker S.J., et al. Interplay of erythropoietin, fibroblast growth factor 23, and erythroferrone in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood Adv* 2020; 4 (8): 1678–82.
21. Clinkenbeard E.L., Hanudel M.R., Stayrook K.R., Appaiah H.N., Farrow E.G., Cass T.A., et al. Erythropoietin stimulates murine and human fibroblast growth factor-23, revealing novel roles for bone and bone marrow. *Haematologica* 2017; 102 (11): e427.
22. Bross R., Zitterkoph J., Pithia J., Benner D., Rambod M., Kovesdy C.P., et al. Association of serum total iron-binding capacity and its changes over time with nutritional and clinical outcomes in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2009; 29 (6): 571–81.
23. Thang L.V., Kien N.T., Van Hung N., Kien T.Q., Dung N.H., Thu Huong N.T., et al. Serum total iron-binding capacity and iron status in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease: A cross-sectional study in Vietnam. *Asia Pac J Clin Nutr* 2020; 29 (1): 48–54.
24. Ryu S.-R., Park S.K., Jung J.Y., Kim Y.H., Oh Y.K., Yoo T.H., Sung S. The prevalence and management of anemia in chronic kidney disease patients: result from the KoreaN Cohort Study for Outcomes in Patients with Chronic Kidney Disease (KNOW-CKD). *J Korean Med Sci* 2017; 32 (2): 249–56.
25. Kurella Tamura M., Vittinghoff E., Yang J., Go A.S., Seliger S.L., Kusek J.W., et al. Anemia and risk for cognitive decline in chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 2016; 17 (1): 1–7.
26. Lukaszyk E., Lukaszyk M., Koc-Zorawska E., Bodzenta-Lukaszyk A., Malyszko J. Fibroblast growth factor 23, iron and inflammation—are they related in early stages of chronic kidney disease? *Arch Med Sci* 2017; 13 (4): 845.
27. Alzaheb R.A., Al-Amer O. The prevalence of iron deficiency anemia and its associated risk factors among a sample of female university students in Tabuk, Saudi Arabia. *Clin Med Insights Women's Health* 2017; 10: 1179562X17745088.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 14.06.2023
Принята к печати 14.07.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-136-145

Диагностическая значимость сывороточного эритропоэтина как маркера перинатального поражения головного мозга у недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела при рождении

Д.Р. Шарафутдинова^{1,2}, Е.Н. Балашова¹, Ю.В. Кесслер¹, И.А. Ведихина¹, Ю.В. Сухова¹, А.Р. Киртбая^{1,2}, А.Ю. Рындин^{1,2}, Т.Ю. Иванец¹, О.В. Ионов¹⁻³

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

²ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

³ГБУЗ МО «Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области»

Поиск перспективных маркеров повреждения головного мозга у недоношенных новорожденных представляет большой интерес и имеет важное значение для разработки и оптимизации индивидуальных диагностических и терапевтических подходов нейропротекции в неонатологии. Цель: оценить диагностическую значимость сывороточного эритропоэтина (сЭПО) в 1-е сутки жизни (с. ж.) как маркера перинатального поражения головного мозга у недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела (ОНМТ) при рождении. Исследование одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований (протокол №12 от 17 ноября 2016 г.) и утверждено решением ученого совета (протокол №19 от 29 ноября 2016 г.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. От родителей пациентов было получено письменное информированное согласие на включение в исследование. В исследование были включены 47 недоношенных новорожденных с ОНМТ, родившихся в 2018 г. в ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, у которых в 1-е с. ж. определялась концентрация сЭПО в венозной крови. В зависимости от уровня сЭПО новорожденные были разделены на 3 группы: 1-я группа – недоношенные новорожденные с ОНМТ с низкой концентрацией сЭПО в 1-е с. ж. (< 20 МЕ/л, $n = 24$); 2-я группа – недоношенные новорожденные с ОНМТ со средней концентрацией сЭПО (20–39 МЕ/л, $n = 14$) (референтные значения) – группа сравнения; 3 группа – недоношенные новорожденные с ОНМТ с повышенной концентрацией сЭПО (≥ 40 МЕ/л, $n = 9$). Мы определяли частоту поражения головного мозга, включая внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) и перивентрикулярную лейкомаляцию. В исследуемой когорте концентрация сЭПО не коррелировала с гестационным возрастом. В 1-й группе ВЖК \leq II степени отмечались у 4/24 (16,7%) новорожденных, во 2-й группе ВЖК \leq II степени – у 3/14 (21,4%), ВЖК III степени – у 1/14 (7,1%), в 3-й группе ВЖК \leq II степени – у 1/9 (11,1%), ВЖК III степени – у 1/9 (11,1%), $p > 0,05$. Случаев перивентрикулярной лейкомаляции среди исследуемых новорожденных не отмечалось. Высокая концентрация сЭПО в 1-е с. ж. у недоношенных новорожденных с ОНМТ не была связана с повышением риска перинатального поражения головного мозга. Клиническая ценность и практическая значимость определения сЭПО в 1-е с. ж. как маркера перинатального поражения головного мозга у недоношенных новорожденных с ОНМТ не продемонстрировали высокой информативности. Для оценки роли сЭПО в прогнозировании неонатальных исходов требуются дальнейшие исследования.

Ключевые слова: недоношенный новорожденный, сывороточный эритропоэтин, рекомбинантный человеческий эритропоэтин, внутрижелудочковые кровоизлияния, перивентрикулярная лейкомаляция

Шарафутдинова Д.Р. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 136–45. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-136-145

Diagnostic significance of serum erythropoietin as a marker of perinatal brain damage in premature newborns with very low birth weight

D.R. Sharafutdinova^{1,2}, E.N. Balashova¹, Yu.V. Kessler¹, I.A. Vedikhina¹, Yu.V. Sukhova¹, A.R. Kirtbaya^{1,2}, A.Yu. Ryndin^{1,2}, T.Yu. Ivanets¹, O.V. Ionov¹⁻³

¹National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (the Sechenov University), Moscow

³Research Clinical Institute of Childhood of the Ministry of Health of the Moscow Region, Moscow

Контактная информация:

Шарафутдинова Дияна Рашидовна,
канд. мед. наук, старший научный
сотрудник, врач-анестезиолог-
реаниматолог отделения реанимации и
интенсивной терапии
им. проф. А.Г. Антонова Института
неонатологии и педиатрии;
ассистент кафедры непрерывного
профессионального образования и
симуляционных технологий ФГБУ «НМИЦ
АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава
России; доцент кафедры неонатологии
Клинического института детского здоровья
им. Н.Ф. Филатова ФГАУ ВО «Первый
МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава
России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119435, Москва,
ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4
E-mail: dikarush@gmail.com

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 14.06.2023

Accepted 14.07.2023

The search for promising markers of brain damage in premature newborns is important for the development and optimization of individual diagnostic and therapeutic approaches to neuroprotection in neonatology. Objective: to evaluate the diagnostic significance of serum erythropoietin (sEPO) on the 1st day of life as a marker of perinatal brain damage in premature infants with very low birth weight (VLBW). The study protocol was approved by the Biomedical Research Ethics Committee (Minutes No.12 of 17 November 2016) and the Scientific Council (Minutes No.19 of 29 November 2016) of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Written informed consent to the patients' participation in the study was obtained from their parents. The study included 47 premature infants with VLBW born in 2018 at the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. sEPO was determined on the 1st day of life. Depending on the level of sEPO, infants were divided into 3 groups: group 1 – premature infants with VLBW with a low sEPO level on the 1st day of life (< 20 IU/L, n = 24); group 2 – premature infants with VLBW with an average sEPO level of 20–39 IU/L (reference values) (n = 14) – control group; group 3 – premature infants with VLBW with an elevated sEPO level (≥ 40 IU/L, n = 9). We determined the frequency of brain damage, including intraventricular hemorrhages (IVH) and periventricular leukomalacia. sEPO was not correlated with gestational age. In group 1, IVH ≤ Grade II was observed in 4/24 (16.7%) infants; in group 2, IVH ≤ Grade II was observed in 3/14 (21.4%) infants, and 1/14 (7.1%) infant had IVH Grade III; in group 3, IVH ≤ Grade II was noted in 1/9 (11.1%) infant, and IVH Grade III – in 1/9 (11.1%) infant, p > 0.05. There were no cases of periventricular leukomalacia. A high sEPO level on the 1st day of life in premature infants with VLBW was not associated with an increased risk of perinatal brain damage. The clinical value and practical significance of the determination of sEPO on the 1st day of life as a marker of perinatal brain damage in premature infants with VLBW did not demonstrate any benefits. Further studies are required to assess the role of sEPO in predicting neonatal outcomes.

Key words: premature infants, serum erythropoietin, recombinant human erythropoietin, intraventricular hemorrhages, periventricular leukomalacia

Sharafutdinova D.R., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 136–45.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-136-145

Эритропоэтин (ЭПО) является гормоном, синтез которого увеличивается в условиях гипоксии [1]. Согласно данным литературы, ЭПО не проникает через плаценту [2]. Повышение концентрации ЭПО в плазме плода свидетельствует о его гипоксии и имеет сильную корреляцию с ее выраженностью [3]. Согласно доклиническим исследованиям, ЭПО обладает нейропротективными свойствами [4]. Предварительные результаты использования экзогенного ЭПО в качестве нейропротекторного средства были многообещающими при неонатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии [5] и показали улучшение когнитивных результатов у недоношенных новорожденных [6, 7]. Однако в 2 рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях 2016 и 2020 гг. сообщалось, что у крайне и очень недоношенных новорожденных лечение высокими дозами ЭПО рутинно не рекомендуется и не оправдано, так как статистически значимо не снижает риск развития неврологических нарушений, оцениваемых с использованием шкалы Бейли, в возрасте 2 лет [8, 9]. На следующем этапе исследования и при проведении анализа результатов среди детей в возрасте 5 лет показатели развития нервной системы также не различались [10]. Что касается эндогенного ЭПО, то его высокая концентрация в крови в течение первых дней жизни у крайне недоношенных новорожденных ассоциирована с неонатальной заболеваемостью [11] и неонатальной энцефалопатией, отклонениями по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга и смертностью у доношенных детей, перенесших перинатальную асфиксию [12].

Существуют немногочисленные данные о связи между уровнями эндогенного ЭПО при рождении и исходами у недоношенных новорожденных, в том числе исходами и заболеваниями нервной системы.

Известно, что наиболее высокому риску перинатального поражения головного мозга подвержены недоношенные новорожденные. Сохраняется большой интерес к выявлению ранних и прогностически значимых биологических маркеров и предикторов перинатального поражения головного мозга у недоношенных новорожденных как в раннем, так и в позднем неонатальном периодах.

Цель нашего исследования – оценить диагностическую значимость сывороточного ЭПО (сЭПО) в 1-е сутки жизни (с. ж.) как маркера перинатального поражения головного мозга, включая внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК), перивентрикулярную лейкомаляцию (ПВЛ), у недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела (ОНМТ) при рождении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ретроспективное исследование были включены недоношенные новорожденные с ОНМТ, родившиеся в 2018 г. в ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, у которых определялась концентрация сЭПО в 1-е с. ж. (n = 56). Критериями исключения были серьезные врожденные пороки развития, генетические синдромы, водянка плода, наследственные метаболические нарушения обмена веществ. Мы исключили из исследования 3 новорожденных, умерших в течение первой недели жизни и 6 новорожденных, у которых отмечался выраженный гемолиз в образцах крови. Таким образом, в исследование были включены 47 недоношенных новорожденных с ОНМТ (рисунки 1).

Исходя из поставленной цели, мы проводили деление детей на группы и анализ данных, основыв-

Correspondence:

Diiana R. Sharafutdinova, Cand. Med. Sci., a senior researcher, an anesthesiologist-intensivist at the A.G. Antonov Intensive Care Unit of the Institute of Neonatology and Pediatrics; assistant of the Department of Continuing Professional Education and Simulation Technologies, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Associate Professor at the Department of Neonatology of the N.F. Filatov Clinical Institute for Children's Health, the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenov University) Address: 2, building 4 Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia E-mail: dikarush@gmail.com

ваясь на полученных значениях сЭПО в 1-е с. ж. На основании исследований [13–15], в которых приводятся сведения о средних и медианных значениях концентрации сЭПО у новорожденных, мы приняли описанные значения, равные 20–39 МЕ/л, в качестве референтных. В соответствии с полученными данными концентрации сЭПО венозной крови в 1-е с. ж. новорожденные были разделены на 3 группы:

- 1-я группа: недоношенные новорожденные с ОНМТ с низкой концентрацией сЭПО в 1-е с. ж. (< 20 МЕ/л, $n = 24$);

- 2-я группа: недоношенные новорожденные с ОНМТ со средней концентрацией сЭПО (20–39 МЕ/л, $n = 14$) (референтные значения) – группа сравнения;

- 3-я группа: недоношенные новорожденные с ОНМТ с повышенной концентрацией сЭПО (≥ 40 МЕ/л, $n = 9$).

Проведен анализ особенностей соматического анамнеза, течения беременности и родов у матерей исследуемых новорожденных (таблицы 1, 2). В исследуемую популяцию вошли 28 женщин с медианой возраста 35,5 года. Критериями диагноза анемии у женщин являлись значения гемоглобина менее 109 г/л. Согласно критериям Всемирной организации здравоохранения, анемия легкой степени диагностировалась при уровне гемоглобина 90–109 г/л, анемия средней тяжести – при гемоглобине 70–89 г/л и тяжелая анемия – при гемоглобине менее 70 г/л [16].

Характеристики детей при рождении представлены в таблице 3 (гестационный возраст (ГВ), антропометрические данные при рождении, оценка по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах жизни). Оценка физического развития проводилась с использованием дифференцированных по полу детей междуна-

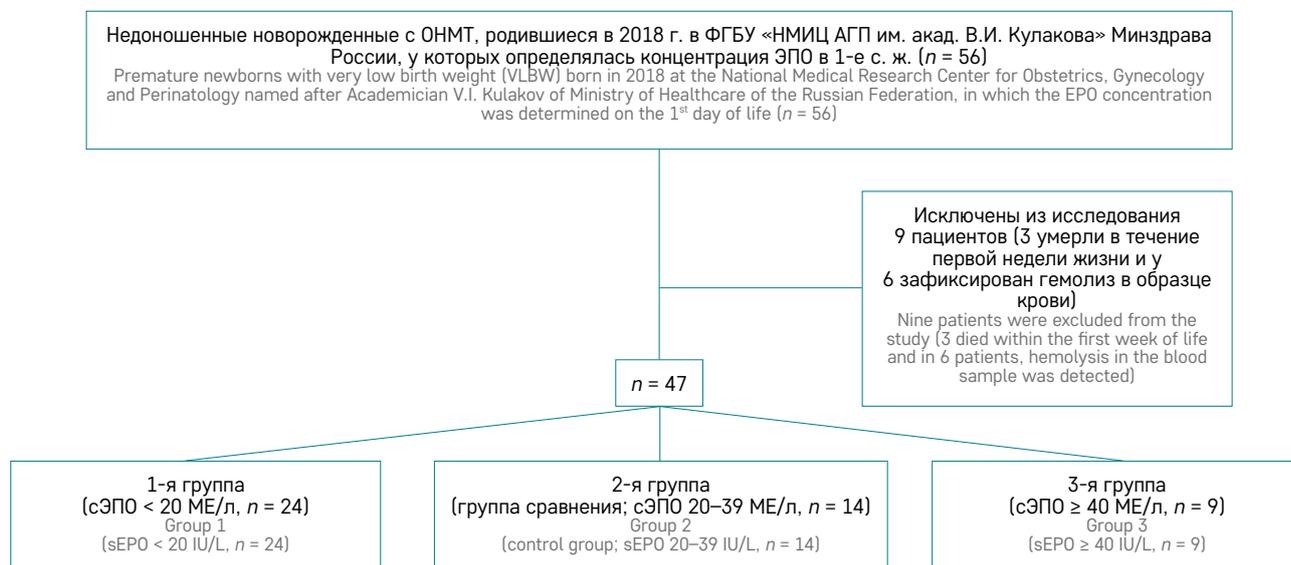
родных диаграмм INTERGROWTH-21st (Международный консорциум по росту плода и новорожденного) [17]. В случаях, когда масса тела при рождении была равной значению менее 10-го перцентиля, регистрировалась малая масса для ГВ; при сочетании массы и длины тела при рождении, равных значениям менее 10-го перцентиля, – малый размер для ГВ, если масса была выше 90-го перцентиля, выставлялся диагноз крупновесный для ГВ. В каждой группе проведена оценка частоты ВЖК с указанием степени тяжести, ПВЛ. Диагноз ВЖК устанавливался согласно классификации, предложенной Российской ассоциацией специалистов перинатальной медицины (РАСПМ) [18]. Диагноз ПВЛ устанавливался с учетом данных ультразвукового исследования (УЗИ) и МРТ головного мозга.

Концентрация ЭПО определялась в течение первого часа жизни в сыворотке крови до назначения парентеральной дотации белков, жиров, витаминов, рекомбинантного человеческого ЭПО (рчЭПО) и энтерального питания. Определение концентрации сЭПО проводилось с использованием иммуноферментного метода с хемилюминесцентной детекцией ELISA (Biomerica, Германия). Венозная кровь в объеме 1,0 мл собиралась с пробирку с гепарином. Образцы венозной крови от пациентов центрифугировались в тот же день. Полученная сыворотка алиquotировалась и замораживалась при -70°C .

Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований (протокол №12 от 17 ноября 2016 г.) и утверждено решением ученого совета (протокол №19 от 29 ноября 2016 г.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. От родителей было получено письменное информированное согласие на включение в исследование.

Рисунок 1
Формирование выборки пациентов

Figure 1
Flow chart of patient enrollment
sEPO – serum erythropoietin



Статистический анализ

Статистический анализ проводился с помощью программы IBM SPSS Statistics, версия 20.0. Характеристики новорожденных и их матерей представлены в виде абсолютных и относительных значений. Сравнение распределения проводилось с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Учитывая отсутствие нормального распределения переменных, применялись непараметрические методы анализа. Категориальные переменные описаны с помощью значений медианы с интерквартильным размахом (interquartile range, IQR), который представляет собой разницу между 1-м и 3-м квартилями (Q1–Q3), или 25-м и 75-м процентилями, а также указанием наименьшего и наибольшего значений переменной (min–max). Изменения количественных переменных в исследуемых группах анализировали с помощью непараметрического теста Краскала–Уоллиса. При сравнении качественных переменных использовался критерий χ^2 Пирсона (ожидаемое явление > 10), χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса (ожидаемое явление > 5, но < 10), точный критерий Фишера (ожидаемое явление < 5), отношение шансов (ОШ) с 95% доверительными интервалами (ДИ). Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициентов корреляции Пирсона и оценки силы корреляционной

связи по шкале Чеддока, где значения < 0,1 характеризуют отсутствие связи, 0,1–0,3 – слабую связь, 0,3–0,5 – умеренную, 0,5–0,7 – заметную, более 0,7 – высокую связь. Значения p ниже 0,05 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В таблице 1 представлены данные анамнеза, течения беременности женщин, родивших детей, включенных в исследование.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, частота хронического гломерулонефрита, сахарного диабета, гестационного сахарного диабета, артериальной гипертензии, преэклампсии, нарушений фетоплацентарных кровотоков, задержки роста плода, анемии перед родоразрешением (легкой и средней степени тяжести) между исследуемыми группами статистически значимо не отличалась. Анемии тяжелой степени перед родоразрешением у исследуемых женщин не отмечалось. Почти у половины женщин перед родоразрешением регистрировалась анемия легкой и средней степени тяжести. Значимой корреляции между уровнем гемоглобина у женщин перед родоразрешением и концентрацией сЭПО у их недоношенных новорожденных не выявлено ($p = 0,922$).

Таблица 1
Особенности анамнеза и течения беременности женщин

Table 1
The maternal medical history and the course of pregnancy

Параметр Parameter	1-я группа (сЭПО < 20 МЕ/л, $n = 24$) Group 1 (sEPO < 20 IU/L, $n = 24$)	2-я группа (группа сравнения; сЭПО 20–39 МЕ/л, $n = 14$) Group 2 (control group; sEPO 20–39 IU/L, $n = 14$)	3-я группа (сЭПО ≥ 40 МЕ/л, $n = 9$) Group 3 (sEPO ≥ 40 IU/L, $n = 9$)	p
Возраст, годы, медиана (IQR) Age, years, median (IQR)	38,5 (34,0–40,0)	34,0 (25,0–37,0)	28,0 (31,0–33,0)	0,101
Хронический гломерулонефрит, n (%) Chronic glomerulonephritis, n (%)	1 (4,2)	1 (7,1)	0	0,709
Сахарный диабет, n (%) Diabetes mellitus, n (%)	1 (4,2)	0	0	–
Гестационный сахарный диабет, n (%) Gestational diabetes mellitus, n (%)	2 (8,3)	0	0	–
Артериальная гипертензия, n (%) Arterial hypertension, n (%)	5 (20,8)	3 (21,4)	2 (22,2)	0,999
Преэклампсия, n (%) Preeclampsia, n (%)	9 (37,5)	2 (14,3)	2 (22,2)	0,192
Многоплодная беременность, n (%) Multiple pregnancy, n (%)	12 (50)	7 (50,0)	3 (33,3)	0,609
Нарушение фетоплацентарных кровотоков, n (%) Impaired fetoplacental blood flow, n (%)	6 (25,0)	4 (28,6)	4 (44,4)	0,588
Задержка роста плода, n (%) Fetal growth restriction, n (%)	2 (8,3)	4 (28,6)	3 (33,3)	0,171
Анемия перед родоразрешением, n (%) Predelivery anemia, n (%)	12 (50,0)	6 (42,8)	2 (22,2)	0,138
Анемия легкой степени перед родоразрешением, n (%) Mild predelivery anemia, n (%)	7 (29,2)	4 (28,5)	2 (22,2)	0,517
Анемия средней степени перед родоразрешением, n (%) Moderate predelivery anemia, n (%)	5 (20,8)	2 (14,3)	0	0,375
Гемоглобин у женщин перед родоразрешением, г/л, медиана (IQR) Predelivery hemoglobin level in women, g/L, median (IQR)	111,5 (99,0–127,0)	122,0 (117,0–130,0)	115,0 (111,0–116,0)	0,951

Note. IQR – interquartile range.

В таблице 2 представлены способы родоразрешения и показания к экстренному оперативному родоразрешению.

В большинстве случаев родоразрешение проводилось путем кесарева сечения (таблица 2). Дети с высоким уровнем сЭПО чаще рождались путем экстренного кесарева сечения (66,7%), однако статистически значимой разницы при сравнении с другими группами не выявлено. Ведущим показанием к экстренному родоразрешению являлось ухудшение состояния плода при нарушении фетоплацентарных кровотоков (нулевом или реверсном диастолическом кровотоке в артериях пуповины) по данным УЗ-доплерографии.

Всем новорожденным проводилось сцеживание или отсроченное пережатие пуповины после рождения (таблица 3).

Частота проведения процедур сцеживания или отсроченного пережатия пуповины в группах были сопоставимы (таблица 3).

Медиана сЭПО в 1-е с. ж. у всех недоношенных новорожденных с ОНМТ составила 17,9 МЕ/л (IQR 9,9–30,2 МЕ/л). В таблице 4 приведены медианы концентрации сЭПО в каждой группе.

Характеристика новорожденных при рождении представлена в таблице 5.

Из 47 живорожденных детей, вошедших в исследование, 34% ($n = 16/47$) родились с массой тела менее 1000 г, 66% ($n = 31/47$) – с массой 1000–1499 г. Медиана ГВ составила 30,0 недели. Статистически значимых отличий в ГВ, антропометрических данных при рождении, оценке по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах жизни между группами не выявлено (таблица 5). Значимой корреляции между ГВ и концентрацией сЭПО в 1-е с. ж. не обнаружено, $p = 0,719$.

Основные диагнозы детей представлены в таблице 6.

Как видно из данных, представленных в таблице 6, практически у всех новорожденных, включенных

Таблица 2
Способы родоразрешений

Table 2
The types of delivery

Параметр Parameter	1-я группа (сЭПО < 20 МЕ/л, $n = 24$) Group 1 (sEPO < 20 IU/L, $n = 24$)	2-я группа (группа сравнения; сЭПО 20–39 МЕ/л, $n = 14$) Group 2 (control group; sEPO 20–39 IU/L, $n = 14$)	3-я группа (сЭПО ≥ 40 МЕ/л, $n = 9$) Group 3 (sEPO ≥ 40 IU/L, $n = 9$)	p
Вагинальные роды, n (%) Vaginal delivery, n (%)	2 (8,3)	1 (7,1)	1 (11,1)	0,680
Оперативные роды, n (%) Operative delivery, n (%)				
Вакуум-экстракция Vacuum extraction	0	0	0	–
Плановое кесарево сечение Planned caesarean section	16 (66,7)	6 (42,9)	3 (33,3)	0,334
Экстренное кесарево сечение Emergency caesarean section	6 (25,0)	7 (50,0)	5 (55,5)	0,310
Показания к экстренному кесареву сечению, n (%) Indications for emergency caesarean section, n (%)				
Нарушение фетоплацентарных кровотоков Impaired fetoplacental blood flow	5/6 (83,3)	4/7 (57,2)	4/5 (80,0)	0,588
Кровотечение, отслойка плаценты Bleeding, placental abruption	1/6 (16,7)	3/7 (42,8)	1/5 (20,0)	0,417

Таблица 3
Частота проведения сцеживания или отсроченного пережатия пуповины в исследуемых группах

Table 3
The frequency of umbilical cord milking or delayed umbilical cord clamping in the study groups

Параметр Parameter	1-я группа (сЭПО < 20 МЕ/л, $n = 24$) Group 1 (sEPO < 20 IU/L, $n = 24$)	2-я группа (группа сравнения; сЭПО 20–39 МЕ/л, $n = 14$) Group 2 (control group; sEPO 20–39 IU/L, $n = 14$)	3-я группа (сЭПО ≥ 40 МЕ/л, $n = 9$) Group 3 (sEPO ≥ 40 IU/L, $n = 9$)	p
Сцеживание пуповины, n (%) Umbilical cord milking, n (%)	14 (58,3)	8 (57,1)	5 (55,6)	0,700
Отсроченное пережатие пуповины (более 60 с), n (%) Delayed umbilical cord clamping (more than 60 seconds), n (%)	8 (33,3)	5 (35,7)	4 (44,4)	0,898

Таблица 4
Концентрация сЭПО в 1-е с. ж. пациентов, включенных в исследование

Table 4
The sEPO concentration on the 1st day of life in patients included in the study

Параметр Parameter	1-я группа (сЭПО < 20 МЕ/л, $n = 24$) Group 1 (sEPO < 20 IU/L, $n = 24$)	2-я группа (группа сравнения; сЭПО 20–39 МЕ/л, $n = 14$) Group 2 (control group; sEPO 20–39 IU/L, $n = 14$)	3-я группа (сЭПО ≥ 40 МЕ/л, $n = 9$) Group 3 (sEPO ≥ 40 IU/L, $n = 9$)
сЭПО в 1-е с. ж., МЕ/л, медиана (IQR) sEPO on the 1 st day of life, IU/L, median (IQR)	11,0 (7,7–15,2)	26,7 (24,2–29,0)	67,7 (58,2–83,8)

в исследование, основным диагнозом являлась врожденная пневмония – 40/47 (85,1%), у 1/47 (2,1%) – врожденный сепсис, у 6/47 (1,8%) – респираторный дистресс-синдром, отличий между группами не выявлено.

В таблице 7 представлена частота ВЖК, постгеморрагической вентрикуломегалии и ПВП в группах недоношенных новорожденных с ОНМТ.

При анализе частоты таких перинатальных поражений головного мозга, как ВЖК различных степеней,

постгеморрагическая вентрикуломегалия, в исследуемых группах недоношенных новорожденных с ОНМТ значимых отличий не выявлено. Ни у одного ребенка среди исследуемых новорожденных не была зарегистрирована ПВП (таблица 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гипоксия является одним из ведущих факторов повреждения головного мозга. Поскольку вслед-

Таблица 5
Параметры новорожденных при рождении в исследуемых группах

Table 5
The parameters at birth of newborns in the study groups

Параметр Parameter	1-я группа (сЭПО < 20 МЕ/л, n = 24) Group 1 (sEPO < 20 IU/L, n = 24)	2-я группа (группа сравнения; сЭПО 20–39 МЕ/л, n = 14) Group 2 (control group; sEPO 20–39 IU/L, n = 14)	3-я группа (сЭПО ≥ 40 МЕ/л, n = 9) Group 3 (sEPO ≥ 40 IU/L, n = 9)	p
ГВ, недели, медиана (IQR) Gestational age (GA), weeks, median (IQR)	30,0 (29,0–32,0)	29,0 (28,0–30,0)	30,0 (30,0–31,0)	0,278
ГВ, недели, медиана (min–max) GA, weeks, median (min–max)	30,0 (26,5–34,0)	29,0 (26,0–34,0)	30,0 (28,0–31,5)	
Масса тела при рождении, г, медиана (IQR) Birth weight, g, median (IQR)	1290 (992,5–1388,5)	1220 (983–1280)	1210 (817–1390)	0,502
Масса тела при рождении, г, медиана (min–max) Birth weight, g, median (min–max)	1290 (597,5–1487,5)	1220 (820–1385)	1210 (780–1415)	
Масса тела при рождении < 1000 г, n (%) Birth weight < 1000 g, n (%)	16 (66,7)	9 (64,3)	6 (66,7)	0,988
Масса тела при рождении ≥ 1000 г, n (%) Birth weight ≥ 1000 g, n (%)	8 (33,3)	5 (35,7)	3 (33,3)	0,988
Длина, см, медиана (IQR) Length, cm, median (IQR)	27,0 (35,5–39,0)	37,0 (34,5–39,0)	38,0 (35,0–41,0)	0,634
Масса-ростовые показатели соответствуют ГВ, n (%) Weight and height parameters are appropriate for GA, n (%)	17 (70,8)	12 (85,7)	6 (66,7)	0,500
Малый размер для ГВ, n (%) Small size for GA, n (%)	6 (25,0)	2 (14,3)	2 (22,2)	0,736
Малая масса для ГВ, n (%) Low weight for GA, n (%)	1 (4,3)	0	1 (11,1)	0,443
Крупновесный для ГВ, n (%) High weight for GA, n (%)	0	0	0	–
Мальчик/девочка, n Male/female, n	14/10	8/6	6/3	0,888
Оценка по шкале Апгар, 1-я минута, баллы, медиана (IQR) Apgar score at 1 minute, median (IQR)	6,5 (6,0–7,0)	6,0 (6,0–7,0)	7,0 (6,0–7,0)	0,560
Оценка по шкале Апгар, 1-я минута, баллы, медиана (min–max) Apgar score at 1 minute, median (min–max)	6,5 (4,0–7,0)	6,0 (1,0–7,0)	7,0 (2,0–7,0)	
Оценка по шкале Апгар, 5-я минута, баллы, медиана (IQR) Apgar score at 5 minutes, median (IQR)	8,0 (7,0–8,0)	7,0 (7,0–8,0)	8,0 (7,0–8,0)	0,158
Оценка по шкале Апгар, 5-я минута, баллы, медиана (min–max) Apgar score at 5 minutes, median (min–max)	8,0 (6,0–8,0)	7,0 (3,0–8,0)	8,0 (4,0–8,0)	

Таблица 6
Основные диагнозы в исследуемых группах

Table 6
Main diagnoses in the study groups

Основной диагноз Main diagnosis	1-я группа (сЭПО < 20 МЕ/л, n = 24) Group 1 (sEPO < 20 IU/L, n = 24)	2-я группа (группа сравнения; сЭПО 20–39 МЕ/л, n = 14) Group 2 (control group; sEPO 20–39 IU/L, n = 14)	3-я группа (сЭПО ≥ 40 МЕ/л, n = 9) Group 3 (sEPO ≥ 40 IU/L, n = 9)	p
Врожденная пневмония, n (%) Congenital pneumonia, n (%)	21 (87,5)	11 (78,6)	8 (88,9)	0,527
Врожденный сепсис, n (%) Congenital sepsis, n (%)	0	1 (7,1)	0	–
Респираторный дистресс-синдром, n (%) Respiratory distress syndrome, n (%)	3 (12,5)	2 (14,3)	1 (11,1)	0,869

Таблица 7

Частота ВЖК, постгеморрагической вентрикуломегалии и ПВ в исследуемых группах

Table 7

The frequency of intraventricular hemorrhages (IVH) and periventricular leukomalacia (PVL) in the study groups

Неонатальные исходы Neonatal outcomes	1-я группа (сЭПО < 20 МЕ/л, n = 24) Group 1 (sEPO < 20 IU/L, n = 24)	2-я группа (группа сравнения; сЭПО 20–39 МЕ/л, n = 14) Group 2 (control group; sEPO 20–39 IU/L, n = 14)	3-я группа (сЭПО ≥ 40 МЕ/л, n = 9) Group 3 (sEPO ≥ 40 IU/L, n = 9)	p
ВЖК I степени, n (%) IVH grade I, n (%)	3 (12,5)	2 (14,3)	1 (11,1)	0,970
ВЖК II степени, n (%) IVH grade II, n (%)	1 (4,2)	1 (7,1)	0	0,723
ВЖК III степени, n (%) IVH grade III, n (%)	0	1 (7,1)	1 (11,1)	0,348
Постгеморрагическая вентрикуломегалия, n (%) Posthemorrhagic ventriculomegaly, n (%)	0	0	1 (11,1)	–
ПВП, n (%) PVL, n (%)	0	0	0	–

ствии гипоксии концентрация ЭПО повышается, он может быть полезным биомаркером для прогнозирования патологии со стороны нервной системы. Но для корректной интерпретации изменения концентрации сЭПО в клинической практике следует учитывать, что гипоксия бывает различной этиологии. Она может возникать при снижении парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе, неэффективном газообмене и нарушении транспорта кислорода из атмосферы в кровь, при снижении кислородной емкости крови (при анемии), недостаточности кровообращения, нарушении использования кислорода тканями, вследствие чрезмерной функциональной нагрузки на орган или ткань. Отягощенный соматический, акушерско-гинекологический анамнез и особенности течения беременности могут существенно влиять на неврологические исходы у новорожденных, а связанная с плацентарной недостаточностью хроническая гипоксия играет ключевую роль в формировании задержки роста плода [19]. В нашем исследовании при анализе течения беременности статистически значимых различий между группами мы не обнаружили. Однако обращает на себя внимание, что относительная частота нарушения фетоплацентарных кровотоков в 3-й группе была выше, чем в 1-й и 2-й группах. Таким образом, несмотря на отсутствие статистически значимых отличий, страдание кровотоков в системе «мать–плацента–плод» является безусловным фактором, приводящим к гипоксии плода, что и подтверждается более высокими концентрациями сЭПО у новорожденных этой группы в первые часы жизни.

Известно, что ЭПО не проникает через плаценту [2]. Основываясь на экспрессии ЭПО в ответ на гипоксию, мы предполагали, что наличие и тяжесть анемии у женщин перед родоразрешением может влиять на сЭПО у их новорожденных, повышая его концентрацию. Однако мы получили противоположные результаты. Общая частота анемии легкой и средней степеней тяжести перед родоразрешением в

группах была сопоставима. Между тем, если частота анемии легкой степени в исследуемых группах составляла от 22 до 29% и значимо не отличалась, то относительная частота анемии средней степени тяжести перед родоразрешением чаще встречалась в 1-й группе, в 3-й же группе таких случаев не было зарегистрировано вовсе. Безусловно, исследуемые группы были небольшие, что могло существенно повлиять на результаты. Однако можно предположить, что наличие анемии легкой и средней степени тяжести у женщин перед родоразрешением существенно не влияет и не приводит к гипоксии плода. Вероятно, работают компенсаторные механизмы защиты. Следует учитывать и тот факт, что в наше исследование были включены недоношенные новорожденные с ОНМТ, и их реакция на гипоксию может отличаться от доношенных новорожденных.

Для более точной оценки взаимосвязи концентрации сЭПО и гипоксии при рождении в нашем исследовании концентрация сЭПО определялась в течение первых часов жизни. Основными показаниями к экстренному оперативному родоразрешению путем кесарева сечения являлись ухудшение кровотоков в системе «мать–плацента–плод», кровотечение и отслойка плаценты. При этом статистически значимой разницы в оценке по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах жизни между группами не отмечалось.

Данные литературы о концентрации сЭПО у недоношенных детей различного ГВ немногочисленны и зачастую противоречивы. В исследовании Forestier и соавт. [20] концентрация ЭПО измерялась в 163 образцах крови плода с 18-й недели и до конца беременности. Авторы сообщили, что концентрация ЭПО у плода оставалась стабильной на протяжении всей беременности, отсутствовала достоверная корреляция между концентрацией ЭПО и ГВ. Напротив, Seikku и соавт. [21] обнаружили, что концентрация сЭПО отличалась у доношенных и недоношенных новорожденных и коррелировала с ГВ. Следует отметить, что полученная исследователями

корреляционная связь являлась слабой ($r = 0,250$). В то же время Вагг и соавт. сообщили об отсутствии различий в уровнях сЭПО между доношенными ($n = 13$) и недоношенными ($n = 10$) новорожденными [22]. Ранкен и соавт. [23] определяли концентрацию ЭПО в сыворотке пуповинной крови у доношенных и недоношенных новорожденных и обнаружили, что чем меньше ГВ, тем ниже концентрация сЭПО. Мы определяли концентрацию сЭПО исключительно у недоношенных новорожденных с ОНМТ и не оценивали ее у поздних недоношенных и доношенных новорожденных. Поэтому наши результаты трудно сравнить с описанными выше. Тем не менее мы анализировали значения сЭПО у недоношенных новорожденных различного ГВ и наши результаты не выявили зависимости концентрации сЭПО и ГВ у недоношенных новорожденных с ОНМТ. Медиана ГВ составила 30,0 недели. Концентрация сЭПО в 1-е с. ж. составила 17,9 МЕ/л (IQR 9,9–30,2 МЕ/л). Статистически значимой корреляционной связи между ГВ и концентрацией сЭПО в 1-е с. ж. не выявлено, $p = 0,719$.

В настоящее время опубликовано много исследований об использовании экзогенного ЭПО в качестве нейропротектора у новорожденных. Доказательства нейропротекторной роли ЭПО противоречивы: рандомизированные плацебо-контролируемые исследования 2016 и 2020 гг. не показали никакой пользы и эффективности назначения высоких доз ЭПО в целях улучшения неврологических исходов [8–10]. Изучению же концентрации эндогенного ЭПО и его взаимосвязи с различными неонатальными исходами посвящены немногочисленные исследования. Наиболее раннее из них, проведенное еще в 1988 г., показало, что высокие концентрации ЭПО в плазме крови при острой асфиксии при рождении ($n = 31$, из них 5 недоношенных новорожденных) были связаны с повышением риска развития детского церебрального паралича, низкими показателями нервно-психического развития в возрасте 2 лет (индекс умственного развития по шкале Бейли ниже 90) и смертью [24]. Схожие результаты были получены в исследовании Ранкен и соавт. [23], опубликованном в 2022 г. У 878 детей, родившихся в период с 2012 по 2016 г. в больницах Хельсинкского университета, определялась концентрация ЭПО в сыворотке пуповинной крови при рождении. В когорте, включающей как доношенных, так и недоношенных новорожденных, концентрация сЭПО коррелировала с ГВ ($r = 0,526$) и была ниже у недоношенных детей. Авторы пришли к выводу, что высокая концентрация сЭПО (> 100 МЕ/л) была связана с повышенным риском тяжелой патологии нервной системы (ОШ 4,87; 95% ДИ 1,05–22,58). Korzeniewski и соавт. определяли уровни эндогенного ЭПО на 14-й день у 786 недоношенных новорожденных ГВ менее

28 недель. Высокая концентрация эндогенного ЭПО была связана с повышенным риском повреждения головного мозга у недоношенных новорожденных, очень низкими (< 55) показателями умственного (ОШ 2,3; 95% ДИ 1,5–3,5) или психомоторного (ОШ 2,4; 95% ДИ 1,6–3,7) развития в возрасте 2 лет, а также микроцефалией (ОШ 2,4; 95% ДИ 1,5–3,8) [25]. В группе детей с высокой концентрацией сЭПО и системным воспалительным ответом был выше риск развития венрикуломегалии, гемипаретического церебрального паралича. Вместе с тем ряд исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что ЭПО оказывает антиапоптотическое, противовоспалительное и антиоксидантное действия [26–28]. ЭПО способствует реваскуляризации и нейрогенезу [29–33]. ЭПО также рассматривается как белок, участвующий в регуляции системного воспаления. Согласно данным Suresh и соавт., у недоношенных детей концентрация ЭПО в крови на 1, 7 и 14-й дни после рождения меняется в зависимости от продукции белков воспаления [31]. Высокий уровень ЭПО в сочетании с высокими концентрациями цитокинов в образце крови, взятом в течение первого месяца жизни, был связан с повышенным риском развития синдрома дефицита внимания и гиперактивности у 10-летних детей, родившихся недоношенными [32, 33]. Zageen и соавт. оценивали неврологическое развитие и уровень цитокинов у детей школьного возраста, перенесших гипоксически-ишемическую энцефалопатию в неонатальном периоде [34]. Авторы представили данные о том, что концентрация ЭПО у детей, перенесших гипоксически-ишемическую энцефалопатию, была выше по сравнению с контрольной группой, особенно в ответ на стимуляцию липополисахаридом *in vitro*. В нашем исследовании врожденная инфекция (пневмония, сепсис) регистрировалась во всех группах с одинаковой частотой. В отличие от описанных исследований наша когорта состояла из недоношенных новорожденных с ОНМТ. При анализе влияния высоких концентраций сЭПО на частоту перинатальных поражений головного мозга (ВЖК I–III степеней, постгеморрагическая венрикуломегалия) в группах недоношенных новорожденных с ОНМТ, статистически значимых отличий не выявлено. Случаев ПВЛ ни у одного новорожденного не зарегистрировано.

Высокая эндогенная продукция ЭПО при гипоксическом поражении нервной системы может указывать на то, что, несмотря на нейротрофические эффекты ЭПО, у некоторых новорожденных вследствие тяжелой и продолжающейся гипоксии прогрессирует повреждение головного мозга, и маркером этого поражения является высокая концентрация сЭПО. Также важным является временной фактор. В экспериментальных моделях демонстрируется, что повы-

шение ЭПО в плазме начинается не ранее чем через 90 мин от начала острой гипоксии у взрослых [35] и в течение 2–3 ч у плодов [36, 37]. Пиковые концентрации ЭПО достигаются через 1–2 дня, после чего снижаются. ЭПО не сохраняется в тканях, период его полураспада в крови у новорожденных составляют 2–4 ч [38]. Таким образом, даже если новорожденный ребенок испытывает гипоксию во время родов, сЭПО может еще не успеть отреагировать и повыситься. Поэтому определение концентрации сЭПО в динамике может быть более информативным методом для выявления и оценки длительности гипоксии.

Заметным ограничением нашего исследования был сравнительно небольшой объем выборки. Возможно, при продолжении научной работы и увеличении когорты пациентов полученные результаты будут более информативными и практически значимыми. В текущее исследование были включены только недоношенные новорожденные с ОНМТ, что также может являться ограничением, однако это связано непосредственно с целью и дизайном работы. В данном исследовании мы не проводили анализ изменения концентрации сЭПО в динамике в течение неонатального периода, а также не оценивали отдаленные неврологические исходы у исследуемых групп детей. Вместе с тем проведен достаточно подробный анализ анамнеза матерей, течения беременностей и родов и, соответственно, оценка антенатальных факторов, влияющих на концентрацию сЭПО у детей в первые часы после рождения, что, безусловно, является сильной стороной этого исследования.

Исследования по изучению диагностической значимости сЭПО в качестве маркера, ассоциированного с неонатальными исходами, весьма неоднозначны, а порой и противоречат друг другу. Недостаточно изучена динамика изменения эндогенного ЭПО при терапии экзогенным ЭПО, а также при проведении гемотрансфузий у новорожденных различного ГВ.

Исходя из полученных нами результатов, клиническая ценность и практическая значимость опреде-

ления сЭПО в 1-е с. ж. как маркера перинатального поражения головного мозга у недоношенных новорожденных с ОНМТ в настоящее время требуют дополнительного и тщательного анализа, без которого могут привести к ошибочной интерпретации тяжести поражения и, соответственно, некорректной тактике наблюдения за ребенком. Для оценки роли эндогенного ЭПО в прогнозировании рисков перинатального поражения головного мозга и других неонатальных исходов требуются дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом исследовании нашей целью было определить, является ли сЭПО информативным и диагностически значимым маркером для оценки и прогнозирования риска перинатального поражения головного мозга у недоношенных новорожденных с ОНМТ. Наша гипотеза заключалась в том, что у недоношенных новорожденных с более высокой концентрацией сЭПО могут чаще определяться гипоксические поражения центральной нервной системы. Мы не обнаружили статистически значимой связи между высокой концентрацией сЭПО в 1-е с. ж. и повышенным риском развития поражения головного мозга у недоношенных новорожденных, таких как ВЖК и ПВЛ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Sharafutdinova D.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9626-5481>

Balashova E.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3741-0770>

Vedikhina I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0591-4325>

Sukhova Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9657-5375>

Kirtbaya A.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8157>

Ryndin A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5560-8759>

Ivanets T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7990-0276>

Ionov O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4153-133X>

Литература

- Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 2011; 589: 1251–8. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.195057
- Widness J.A., Schmidt R.L., Sawyer S.T. Erythropoietin transplacental passage – review of animal studies. *J Perinat Med* 1995; 23: 61–70. DOI: 10.1515/jpme.1995.23.1-2.61
- Teramo K.A., Widness J.A. Increased fetal plasma and amniotic fluid erythropoietin concentrations: markers of intrauterine hypoxia. *Neonatology* 2009; 95: 105–16. DOI: 10.1159/000153094
- Rangarajan V., Juul S.E. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol* 2014; 51: 481–8. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.06.008
- Martini S., Austin T., Aceti A., Faldella G., Corvaglia L. Free radicals and neonatal encephalopathy: mechanisms of injury, biomarkers, and antioxidant treatment perspectives. *Pediatr Res* 2020; 87: 823–33. DOI: 10.1038/s41390-019-0639-6
- Ohls R.K., Cannon D.C., Phillips J., Caprihan A., Patel S., Winter S., et al. Preschool assessment of preterm infants treated with darbepoetin and erythropoietin. *Pediatrics* 2016; 137: e20153859. DOI: 10.1542/peds.2015-3859

7. Fischer H.S., Reibel N.J., Buhner C., Dame C. Prophylactic early erythropoietin for neuroprotection in preterm infants: a meta-analysis. *Pediatrics* 2017; 139: e20164317. DOI: 10.1542/peds.2016-4317
8. Natalucci G., Latal B., Koller B., Rügger C., Sick B., Held L., et al. Effect of early prophylactic high-dose recombinant human erythropoietin in very preterm infants on neurodevelopmental outcome at 2 years: a randomized clinical trial. *JAMA* 2016; 315: 2079–85. DOI: 10.1001/jama.2016.5504
9. Juul S.E., Comstock B.A., Wadhawan R., Mayock D.E., Courtney S.E., Robinson T., et al. A randomized trial of erythropoietin for neuroprotection in preterm infants. *N Engl J Med* 2020; 382: 233–43. DOI: 10.1056/NEJMoa1907423
10. Natalucci G., Latal B., Koller B., Rügger C., Sick B., Held L., et al. Neurodevelopmental outcomes at age 5 years after prophylactic early high-dose recombinant human erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *JAMA* 2020; 324: 2324–7. DOI: 10.1001/jama.2020.19395
11. Holm M., Skranes J., Dammann O., Fichorova R.N., Allred E.N., Leviton A. Systemic endogenous erythropoietin and associated disorders in extremely preterm newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2016; 101: 458–63. DOI: 10.1136/archdischild-2015-309127
12. Sweetman D.U., Onwuneme C., Watson W.R., Murphy J.F., Molloy E.J. Perinatal asphyxia and erythropoietin and VEGF: serial serum and cerebrospinal fluid responses. *Neonatology* 2017; 111: 253–9. DOI: 10.1159/000448702
13. Widness J.A., Susa J.B., Garcia J.F., Singer D.B., Sehgal P., Oh W., et al. Increased erythropoiesis and elevated erythropoietin in infants born to diabetic mothers and in hyperinsulinemic rhesus fetuses. *J Clin Invest* 1981; 67: 637–42. DOI: 10.1172/JCI110078
14. Teramo K.A., Widness J.A., Clemons G.K., Voutilainen P., McKinlay S., Schwartz R. Amniotic fluid erythropoietin correlates with umbilical plasma erythropoietin in normal and abnormal pregnancy. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 710–6.
15. Forestier F., Daffos F., Catherine N., Renard M., Andreux J.P. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 1991; 77: 2360–3. DOI: 10.1182/blood.V77.11.2360.2360
16. Всемирная организация здравоохранения. База данных «Здоровье для всех». Наемоглобин concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, 2011 [Electronic resource]. URL: http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin_ru (accessed 28.06.2023).
17. Intergrowth-21st translated resources – charts and tables. [Electronic resource]. URL: <https://intergrowth21.tghn.org/translated-resources> (accessed 28.06.2023).
18. Оказание медицинской помощи новорожденным детям с внутрижелудочковыми кровоизлияниями, постгеморрагической гидроцефалией: Клинические рекомендации. Под ред. Н.Н. Володина, С.К. Горельшева, В.Е. Попова. М.; 2014. 24 с.
19. Клинические рекомендации, утвержденные МЗ РФ. Признаки внутриутробной гипоксии плода, требующие предоставления медицинской помощи матери. Разработчик: ООО «Российское общество акушеров-гинекологов» (РОАГ). М.; 2022.
20. Forestier F., Daffos F., Catherine N., Renard M., Andreux J.P. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 1991; 77: 2360–3. DOI: 10.1182/blood.V77.11.2360.2360
21. Seikku L., Stefanovic V., Rahkonen P., Teramo K., Paavonic J., Tikkanen M., Rahkonen L. Amniotic fluid and umbilical cord serum erythropoietin in term and prolonged pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019; 233: 1–5. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2018.11.022
22. Bahr T.M., Ward D.M., Jia X., Ohls R.K., German K.R., Christensen R.D. Is the erythropoietin-erythroferrone-hepcidin axis intact in human neonates? *Blood Cells Mol Dis* 2021; 88: 102536. DOI: 10.1016/j.bcmd.2021.102536
23. Ruth V., Autti-Ramo I., Granstrom M.L., Korkman M., Raivio K.O. Prediction of perinatal brain damage by cord plasma vasopressin, erythropoietin, and hypoxanthine values. *J Pediatr* 1988; 113: 880–5. DOI: 10.1016/S0022-3476(88)80024-6
24. Rancken E.J., Metsäranta M.P.H., Gissler M., Rahkonen L.K., Haataja L.M. Endogenous erythropoietin at birth is associated with neurodevelopmental morbidity in early childhood. *Pediatr Res* 2022; 92 (1): 307–14. DOI: 10.1038/s41390-021-01679-0
25. Korzeniewski S.J., Allred E., Wells Logan J., Fichorova R.N., Engelke S., Kuban K.C.K. Elevated endogenous erythropoietin concentrations are associated with increased risk of brain damage in extremely preterm neonates. *PLoS One* 2015; 10: e0115083. DOI: 10.1371/journal.pone.0115083
26. Juul S.E., Pet G.C. Erythropoietin and neonatal neuroprotection. *Clin Perinatol* 2015; 42: 469–81. DOI: 10.1016/j.clp.2015.04.004
27. Teramo K.A., Klemetti M.M., Widness J.A. Robust increases in erythropoietin production by the hypoxic fetus is a response to protect the brain and other vital organs. *Pediatr Res* 2018; 84: 807–12. DOI: 10.1038/s41390-018-0054-4
28. Suresh S., Rajvanshi P.K., Noguchi C.T. The many facets of erythropoietin physiologic and metabolic response. *Front Physiol* 2020; 10: 1534. DOI: 10.3389/fphys.2019.01534
29. Martini S., Austin T., Aceti A., Faldella G., Corvaglia L. Free radicals and neonatal encephalopathy: mechanisms of injury, biomarkers, and antioxidant treatment perspectives. *Pediatr Res* 2020; 87: 823–33. DOI: 10.1038/s41390-019-0639-6
30. Шарафутдинова Д.Р., Балашова Е.Н., Павлович С.В., Ионов О.В., Киртбая А.Р., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н. Эффективность применения рекомбинантного человеческого эритропоэтина у детей, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела. *Неонатология: новости, мнения, обучение* 2018; 6 (3 (21)): 41–53.
31. Suresh S., Rajvanshi P.K., Noguchi C.T. The many facets of erythropoietin physiologic and metabolic response. *Front Physiol* 2020; 10: 1534. DOI: 10.3389/fphys.2019.01534
32. Logan J.W., Allred E.N., Fichorova R.N., Engelke S., Dammann O., Leviton A.; ELGAN Study Investigators. Endogenous erythropoietin varies significantly with inflammation-related proteins in extremely premature newborns. *Cytokine* 2014; 69: 22–8. DOI: 10.1016/j.cyt.2014.04.009
33. Allred E.N., Dammann O., Fichorova R.N., Hooper S.R., Hunter S.J., Joseph R.M., et al.; ELGAN Study ADHD symptoms writing group for the ELGAN Study Investigators. Systemic inflammation during the first postnatal month and the risk of attention deficit hyperactivity disorder characteristics among 10 year-old children born extremely preterm. *J Neuroimmune Pharmacol* 2017; 12: 531–43. DOI: 10.1007/s11481-017-9742-9
34. Zareen Z., Strickland T., Mc Eneaney V., Kelly L.A., McDonald D., Sweetman D., Molloy E.J. Cytokine dysregulation persists in childhood post neonatal encephalopathy. *BMC Neurol* 2020; 20: 115. DOI: 10.1186/s12883-020-01656-w
35. Eckardt K.U., Boutellier U., Kurtz A., Schopen M., Koller E.A., Bauer C., et al. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 1989; 66: 1785–88. DOI: 10.1152/jappl.1989.66.4.1785
36. Widness J.A., Teramo K.A., Clemons G.K., Garcia J.F., Cavalieri R.L., Piasecki G.J., et al. Temporal response of immunoreactive erythropoietin to acute hypoxemia in fetal sheep. *Pediatr Res* 1986; 20: 15–9. DOI: 10.1203/00006450-198601000-00004
37. Kakuya F., Shirai M., Takase M., Ishii N., Okuno A. Effect of hypoxia on amniotic fluid erythropoietin levels in fetal rats. *Biol Neonate* 1997; 72: 118–124. DOI: 10.1159/000244474
38. Abbrecht P.H., Littell J.K. Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J Appl Physiol* 1972; 32: 54–8. DOI: 10.1152/jappl.1972.32.1.54

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 14.06.2023
Принята к печати 14.07.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-146-155

Содержание гемоглобина в ретикулоцитах как маркер дефицита железа у недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела при рождении. Простые методы диагностики дефицита железа

Д.Р. Шарафутдинова^{1, 2}, Е.Н. Балашова¹, Ю.В. Кесслер¹, Ю.В. Сухова¹, А.Р. Киртбая^{1, 2}, А.Ю. Рындин^{1, 2}, Т.Ю. Иванец¹, О.В. Ионов¹⁻³

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

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

³ГБУЗ МО «Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области», Москва

Контактная информация:

Шарафутдинова Дияна Рашидовна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, врач-анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии им. проф. А.Г. Антонова Института неонатологии и педиатрии; ассистент кафедры непрерывного профессионального образования и симуляционных технологий ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России; доцент кафедры неонатологии Клинического института детского здоровья им. Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4
E-mail: dikarush@gmail.com

Содержание гемоглобина в ретикулоцитах (RET-He), или эквивалент ретикулоцитов, отражает текущую доступность железа для эритропоэза и представляется многообещающим параметром для выявления дефицита железа (ДЖ) у новорожденных. Цель: определить диагностическую значимость RET-He в качестве маркера ДЖ у недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела (ОНМТ) при рождении. В период с января 2016 г. по декабрь 2018 г. на базе отделений Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России мы провели одноцентровое ретроспективное когортное исследование, в которое были включены 66 недоношенных новорожденных с ОНМТ. Гестационный возраст детей составил от 29 до 32 недель. В течение неонатального периода детям проводилось лабораторное обследование: расширенный клинический анализ крови с оценкой показателей эритропоэза периферической крови в 1-е и 3-и сутки жизни (с. ж.), далее 1 раз в 10–14 дней до выписки из стационара, биохимический анализ крови с определением сывороточного железа, ферритина, трансферрина на 7-е с. ж., далее 1 раз в 10–14 дней до выписки из стационара. Данное клиническое исследование одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований (протокол №12 от 17 ноября 2016 г.) и утверждено решением ученого совета (протокол №19 от 29 ноября 2016 г.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. У недоношенных новорожденных с ОНМТ от рождения и до выписки из стационара значения RET-He плавно снижались (в 1-е с. ж. медиана (интерквартильный размах, interquartile range) составила 40,0 (35,7–41,9) пг, достигая наименьших значений после 3-й недели жизни – 28,4 (25,8–34,8) пг) и соответствовали значениям 33,5 (29,2–36,6) пг на момент выписки. Снижение уровня RET-He сочеталось со снижением уровня ретикулоцитов, при этом уровень гемоглобина не изменялся. Были выявлены статистически значимые корреляции между RET-He и средним содержанием гемоглобина в эритроцитах. Показатель D-He снижался с 1-х по 42-е с. ж. на фоне нарастания анемии. Отмечалась отрицательная сильная корреляционная связь между RET-He и Нуро-He ($p < 0,005$). Начиная с 42-х с. ж., или к моменту выписки отмечалось статистически значимое снижение ферритина у 32% детей ($n = 21$), а RET-He – у 77% ($n = 51$). Была обнаружена корреляционная связь между RET-He и ферритином лишь после 42-х с. ж. у 21 новорожденного с ОНМТ с признаками абсолютного ДЖ ($r = 0,34$, $p = 0,046$). Среди новорожденных без признаков абсолютного ДЖ значимых корреляций не выявлено. Между RET-He и железом и RET-He и трансферрином значимой связи выявлено не было. У недоношенных новорожденных с ОНМТ в возрасте более 42 с. ж. значения RET-He $\leq 28,4$ пг соответствуют ДЖ (чувствительность 83,3% и специфичность 93,7%). Наиболее ранними диагностическими признаками ДЖ у недоношенных новорожденных с ОНМТ являлись снижение RET-He, D-He, RBC-He, повышение MicroR, Нуро-He, предшествовавшие снижению сывороточного железа и ферритина. RET-He наряду с D-He и Нуро-He обладает большой диагностической ценностью для ранней диагностики ДЖ у недоношенных новорожденных с ОНМТ.

Ключевые слова: ретикулоциты, содержание гемоглобина в ретикулоцитах, эквивалент ретикулоцитов, дефицит железа, недоношенные новорожденные с очень низкой массой тела при рождении

Шарафутдинова Д.Р. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 146–55. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-146-155

Reticulocyte hemoglobin content as a marker of iron deficiency in premature newborns with very low birth weight. A simple tool for diagnosing iron deficiency

D.R. Sharafutdinova^{1,2}, E.N. Balashova¹, Yu.V. Kessler¹, Yu.V. Sukhova¹, A.R. Kirtbaya^{1,2}, A.Yu. Ryndin^{1,2}, T.Yu. Ivanets¹, O.V. Ionov¹⁻³

¹National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow

³Research Clinical Institute of Childhood, Ministry of Healthcare of the Moscow Region, Moscow

Reticulocyte hemoglobin content (RET-He) is a promising marker of iron deficiency (ID) in newborns. Objective: to determine the diagnostic value of RET-He as a marker of ID in premature newborns with very low birth weight (VLBW). We conducted a single-center retrospective cohort study, which included 66 premature infants admitted to the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Data were obtained from January 2016 to December 2018. The gestational age ranged from 29 to 32 weeks. Laboratory examination included blood tests on the 1st and 3rd day of life, then every 10–14 days until the discharge from hospital, and the measurements of serum iron, ferritin, transferrin on the 7th day of life, then every 10–14 days until the discharge from hospital. This clinical study was approved by the Biomedical Research Ethics Committee (Minutes No.12 of 17 November 2016) and the Scientific Council (Minutes No.19 of 29 November 2016) of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. RET-He was the highest at birth and declined gradually thereafter in premature newborns reaching the lowest values after 3 weeks of life (median (interquartile range) 28.4 (25.8–34.8) pg (on the 1st day of life – 40.0 (35.7–41.9) pg and 33.5 (29.2–36.6) pg at the time of discharge). A low RET-He level was associated with low reticulocytes, with no changes in hemoglobin. There was a positive correlation between RET-He and MCH. D-He decreased from 1 to 42 days of life as a marker of increasing anemia. There was a negative correlation between RET-He and Hypo-He ($p < 0.005$). Starting from 42 days of life, or by the time of discharge, 32% of premature infants ($n = 21$) had a low ferritin level and 77% ($n = 51$) of premature infants had a low RET-He level, of which 21 infants developed ID (a positive correlation between RET-He and ferritin after 42 days of life ($r = 0.34$, $p = 0.046$)). There was no correlation between RET-He and ferritin in newborns without ID. Also, there were no correlations between RET-He and iron and RET-He and transferrin. After 42 days of life, RET-He less than 28.4 pg was a marker of ID (sensitivity 83.3% and specificity 93.7%). Low RET-He, D-He, RBC-He and high microR, Hypo-He were the earliest markers of ID in premature infants which predicted a decrease in serum iron and ferritin levels. RET-He, D-He and Hypo-He are biomarkers with accurate diagnostic value of ID in premature infants with VLBW.

Key words: reticulocytes, reticulocyte hemoglobin content, iron deficiency, very low birth weight premature infant

Sharafutdinova D.R., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 146–55.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-146-155

Современное развитие перинатологии позволяет обеспечить выживание большинства недоношенных новорожденных, включая и глубоко недоношенных детей. За последние годы значительно изменились вектор мышления и идеология в перинатальной медицине. Ведущим направлением становятся технологии, направленные на обеспечение здоровой жизни детей после выписки, полноценное дальнейшее развитие и качество жизни, улучшение неврологических исходов, максимальную реализацию когнитивного/интеллектуального потенциала среди выживших новорожденных.

Одной из «тихих» патологий, которая может влиять на отдаленные исходы и здоровье выживших новорожденных, является дефицит железа (ДЖ). Недоношенные дети рождаются с более низкими запасами железа и подвергаются риску развития ДЖ в неонатальном периоде [1].

Для оценки метаболизма железа в организме традиционно проводят обследование, включающее определение уровня гемоглобина, эритроцитов, эритроцитарных индексов: средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH), коэффициент вариативности эритроцитов по объему, биохимический анализ крови с определением ферритина, трансферрина, железа.

Современные анализаторы исследуют форменные элементы крови с помощью иннова-

ционной технологии проточной цитофлуориметрии. Благодаря данному лабораторному методу возможным становится оценить не только внешние параметры клеток периферической крови (размер, объем), но и внутренние параметры (ядро, нуклеиновые кислоты). Помимо этого, подсчет клеток производится не в поле зрения, а в объеме крови, что позволяет провести более точный качественный и количественный анализ, а также определение стандартных и дополнительных показателей гемограммы. К дополнительным показателям относятся ретикулоцитарные параметры, которые отражают количество ретикулоцитов (RET), их дифференцировку, основанную на степени зрелости клеток и, соответственно, содержанию нуклеиновых кислот, что, в свою очередь, отражает гемопоэтическую активность костного мозга.

RET являются непосредственными предшественниками зрелых эритроцитов. RET в небольшом количестве попадают из костного мозга в периферическую кровь и после потери остатков рибонуклеиновых кислот (РНК) созревают в зрелые эритроциты в течение 2 дней. Поэтому RET выявляются как в костном мозге, так и в периферической крови [1, 2]. У новорожденных содержание RET в крови выше, чем у взрослых. RET являются наиболее чувствительным маркером эритропоэтической активности костного мозга. Данный показатель широко используется в

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 14.06.2023

Accepted 14.07.2023

Correspondence:

Diana R. Sharafutdinova, Cand. Med. Sci., a senior researcher, an anesthesiologist-intensivist at the A.G. Antonov Intensive Care Unit of the Institute of Neonatology and Pediatrics; assistant of the Department of Continuing Professional Education and Simulation Technologies, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after the Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Associate Professor at the Department of Neonatology of the N.F. Filatov Clinical Institute for Children's Health, the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenov University) Address: 2, building 4 Bolshaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia
E-mail: dikarush@gmail.com

клинической практике для оценки эффективности лечения анемии.

Определение содержания гемоглобина в RET (RET-He), или эквивалент RET, в составе расширенного гематологического анализа имеет доказанную клиническую эффективность, в частности в нефрологии. Так, согласно европейским практическим рекомендациям по лечению заболеваний почек (EBPG и KDOQI), у пациентов рекомендовано определять RET-He в целях оптимизации терапии анемии.

Считается, что из-за короткой продолжительности жизни RET показатель RET-He отражает текущую доступность железа для эритропоэза более точно, чем другие показатели [3]. Поэтому RET-He представляется многообещающим параметром для диагностики и мониторинга ДЖ у новорожденных.

Цель исследования – определить диагностическую значимость RET-He в качестве маркера ДЖ у недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела (ОНМТ) при рождении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с января 2016 г. по декабрь 2018 г. на базе отделений Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН, д-р мед. наук, профессор Г.Т. Сухих) мы провели одноцентровое ретроспективное исследование, в которое были включены недоношенные новорожденные с ОНМТ при рождении (< 1500 г). Данное клиническое исследование одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований (протокол №12 от 17 ноября 2016 г.) и утверждено решением ученого совета (протокол №19 от 29 ноября 2016 г.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. У законных представителей новорожденных были взяты информированные согласия на участие в исследовании.

Рисунок 1
Формирование выборки пациентов

Figure 1
Flow chart of patient enrollment
VLBW – very low birth weight



Критерии исключения: множественные пороки развития, гемолитическая болезнь новорожденных, врожденная анемия, постгеморрагическая анемия, проведение 1 гемотрансфузии эритроцитсодержащими компонентами крови и более во время госпитализации, терапия рекомбинантным человеческим эритропоэтином. С учетом критериев исключения в исследование вошли 66 недоношенных новорожденных с ОНМТ (рисунок 1).

Гестационный возраст (ГВ) новорожденных составил от 29 до 32 недель. Медиана (Me) и интерквартильный размах (interquartile range, IQR) массы тела детей при рождении составили 980 (948–1365) г; Me (IQR) длины – 32,5 (28–36) см; Me (IQR) оценки по шкале Апгар на 1-й минуте – 7 (5–7) баллов, на 5-й минуте – 7 (6–8) баллов. Всем недоношенным новорожденным проводилось отсроченное пережатие пуповины в течение 60–70 с после рождения. В целях профилактики ДЖ назначались пероральные препараты железа в виде Fe³⁺-гидроксид полимальтозного комплекса, начиная с 12–14-х суток жизни (с. ж.), при достижении объема энтерального питания 100 мл/кг/сут. Профилактическая доза препаратов железа составляла от 2 до 4 мг/кг/сут перорально с учетом массы тела при рождении. Me (IQR) возраста выписки новорожденных из стационара составила 56 (48–65) сут.

Лабораторные методы исследования

Для проведения исследований кровь получали из вены утром перед кормлением с помощью систем для венозной крови (Sarstedt, Германия) с активатором свертывания и антикоагулянтом K₃ЭДТА, в зависимости от вида анализа.

Гематологические исследования цельной венозной крови проводили на гематологических автоматических анализаторах фирмы Sysmex XS-800i и XT-350 (Sysmex, Япония) методом флуоресцентной проточной цитометрии.

Биохимические исследования сыворотки крови производили спектрофотометрическими и турбидиметрическими методами на автоматическом биохимическом анализаторе BA-400 (Biosystems, Испания). Для анализа использовали сыворотку, полученную путем центрифугирования при 3000 об/мин не менее 10 мин в центрифуге Eppendorf 5804 (Германия). Центрифугирование проводили не позднее чем через 1 ч после взятия крови.

У всех новорожденных с ОНМТ, включенных в исследование, определяли показатели эритропоэза в периферической крови в возрасте 1 и 3 с. ж., далее 1 раз в 10–14 дней до выписки из стационара.

Определялись следующие показатели:

- гемоглобин (г/л), гематокрит (%);
- MCV (мкм³ или фл);
- MCH в абсолютных единицах (пг), пропорциональное отношению «гемоглобин/количество эритроцитов»;
- MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитарной массе (г/дл), отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином;
- количество RET – предшественников эритроцитов (абс., %);
- индекс продукции RET, который рассчитывается по формуле: $RET (\%) \times \text{гематокрит} / 45 \times 1,85$. Индекс менее 2 говорит о снижении активности продукции эритроцитов, а более 2, напротив, о повышении;
- LFR (low fluorescence reticulocyte fractions, фракция RET с низкой флуоресценцией; %) – RET с низким содержанием РНК, наиболее зрелые;
- MFR (medium fluorescence reticulocyte fractions, фракция RET со средней флуоресценцией; %) – RET со средним содержанием РНК;
- HFR (high fluorescence reticulocyte fractions, фракция RET с высокой флуоресценцией; %) – RET с высоким содержанием РНК, наименее зрелые;
- IRF (Immature Reticulocyte Fraction, незрелая фракция RET; %) – определяется как соотношение молодых, или незрелых, RET и общего количества RET;
- MicroR (%) – микроцитарные эритроциты в процентах от всех эритроцитов;
- MacroR (%) – макроцитарные эритроциты в процентах от всех эритроцитов;
- Hуро-He – процентное соотношение эритроцитов с содержанием клеточного гемоглобина, пг;
- Hурег-He – процентное соотношение эритроцитов с содержанием клеточного гемоглобина, пг;
- RBC-HE (пг) – уровень гемоглобина в эритроцитах, соотношение Hуро-He и Hурег-He; сопоставимо со значением MCH; отражает содержание

железа в гемоглобине эритроцитов за последние 90–120 дней (продолжительность жизни зрелого эритроцита);

- RET-He (пг);
- Delta-He (D-He; пг) – показатель, который рассчитывается как разница между RET-He и RBC-He. В нормальных условиях D-He предполагает положительное значение. Это связано с тем, что в RET содержится большее количество гемоглобина по сравнению с эритроцитами (из-за постепенного снижения гемоглобина в течение жизни эритроцитов).

Определение содержания сывороточного железа, ферритина, трансферрина в сыворотке крови осуществлялось на 7-е с. ж., далее 1 раз в 10–14 дней до выписки из стационара. Признаками ДЖ являлись снижение MCV на 2 SD и более, концентрации сывороточного железа, а также ферритина < 30 мкг/л [3].

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы SPSS v.26. Учитывая отсутствие нормального распределения (по результатам теста Колмогорова–Смирнова, графического анализа данных), для каждого количественного параметра определяли Me, IQR, соответствующий 25-му и 75-му процентилем. Для качественных данных определяли показатели частоты (%). Связь между изучаемыми количественными показателями оценивали по результатам корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции (r) Пирсона и Спирмена и последующим установлением их значимости по критерию t. Показатель корреляции оценивали по шкале Чеддока. Показатель корреляции (r) менее 0,3 считали незначимым, если коэффициент корреляции находился в диапазоне от 0,3 до 0,5 – корреляционная связь умеренной силы, 0,5–0,7 – заметная, более 0,7 – сильная (заметная) корреляционная зависимость. С помощью ROC-анализа определяли пороговое значение раннего диагностического маркера ДЖ с указанием чувствительности и специфичности, описанием площади под кривой, диагностической точности. Сравнение связанных между собой совокупностей (анализ «до–после»; одни и те же пациенты на разных этапах наблюдения) при оценке количественных параметров проводили с помощью критерия Уилкоксона. При сравнении связанных между собой совокупностей (одни и те же пациенты на 3 этапах наблюдения) применяли критерий Фридмана. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (95% уровень значимости).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В таблице 1 представлены показатели эритропоэза периферической крови у недоношенных

новорожденных с ОНМТ в течение периода госпитализации.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, у новорожденных отмечалось снижение концентрации гемоглобина, гематокрита от рождения до выписки из стационара. При статистическом анализе на разных этапах наблюдения с помощью критерия Фридмана нами выявлено, что концентрации гемоглобина и гематокрита после 3-й недели жизни снижались у 76% и 74% новорожденных с ОНМТ соответственно. После 6-й недели жизни или к моменту выписки из стационара у новорожденных отмечалось значимое уменьшение MCV, MCH и MCHC.

У новорожденных с ОНМТ отмечались снижение уровня RET к началу 2-й недели жизни и последующее повышение после 4-й недели жизни. К моменту выписки уровень RET снижался практически в 2 раза по сравнению с уровнем RET при рождении. Индекс продукции RET уменьшался с 7-х по 28-е с. ж. и составлял менее 2, что говорит о снижении активности продукции эритроцитов, далее отмечалось его повышение после 4-й недели жизни.

Отмечалось повышение зрелости показателей эритропоэза в периферической крови. Уменьшалось соотношение молодых, или незрелых, RET и общего количества RET (IRF), количество наименее зрелых RET с MFR и HFR, в то время как показатель LFR повышался.

После 2-й недели жизни у 23% ($n = 15$) исследуемых новорожденных были выявлены признаки ДЖ (снижение сывороточного железа и ферритина). В то же время отмечались снижение MacroR, повышение MicroR и Hуро-He при нормальных значениях гемоглобина и эритроцитов.

Отмечалась сильная отрицательная корреляционная связь между RET-He и Hуро-He в возрасте 3 с. ж. ($r = -0,66, p < 0,001$), 7–12 с. ж. ($r = -0,54, p < 0,001$), 13–21 с. ж. ($r = -0,44, p = 0,004$), 22–28 с. ж. ($r = -0,71, p < 0,001$), 29–42 с. ж. ($r = -0,82, p < 0,001$), более 42 с. ж. ($r = -0,65, p = 0,023$).

В возрасте 29–42 с. ж. между RET-He и MicroR корреляционная связь была прямой, умеренной силы, значимой ($r = 0,52, p = 0,018$), в других возрастных интервалах – незначимой.

Таблица 1

Показатели эритропоэза в клиническом анализе крови у недоношенных новорожденных с ОНМТ. Ме (IQR)

Table 1

Parameters of erythropoiesis in complete blood count tests of premature newborns with VLBW. Median (Me) (interquartile range, IQR)

Показатели эритропоэза Parameters of erythropoiesis	Возраст пациентов, с. ж. Age of patients, days of life						
	1	3	7–12	13–21	22–28	29–42	> 42
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	186,5 (169–200)	166 (143–179)	140,0 (130,0–155,0)	126,0 (121,0–137,5)	113,0 (108,0–119,0)	98,0 (89,0–104,5)	89,5 (86,0–103,0)
Гематокрит, % Hematocrit, %	51,7 (46,8–55)	47 (40,4–50,3)	36,9 (35,3–41,4)	34,6 (21,6–73,5)	32,3 (29,6–32,6)	26,6 (24,7–30,1)	25,3 (24,1–29,3)
MCV, фл MCV, fL	108,1 (103–113,3)	107,4 (103,1–112,4)	100,0 (95,4–102,9)	97,1 (92,8–101,7)	96,3 (92,6–99,1)	89,2 (87,6–97,3)	87,0 (83,2–90,8)
MCH, пг MCH, pg	38,9 (37,5–40,4)	37,9 (36,2–39,6)	36,6 (35,1–38,0)	34,8 (33,8–36,7)	34,8 (32,1–36,0)	32,3 (30,7–37,9)	30,8 (28,8–32,4)
MCHC, г/дл MCHC, g/dL	36,4 (35,1–37)	35,6 (34,4–36,5)	36,4 (35,5–37,5)	36,4 (35,5–36,9)	35,8 (35,0–37,1)	35,6 (34,9–36,4)	35,3 (34,8–35,9)
RET, $\times 10^{12}/л$ RET, $\times 10^{12}/L$	0,352 (0,278–0,419)	0,321 (0,249–0,386)	0,131 (0,04–0,217)	0,117 (0,064–0,216)	0,179 (0,118–0,202)	0,211 (0,108–0,247)	0,199 (0,099–0,224)
RET, %	74,3 (59,3–89,7)	70,9 (52,4–94,9)	26,9 (21,6–32,1)	37,0 (20,3–61,1)	53,1 (37,8–66,8)	60,8 (59,3–79,8)	42,2 (38,9–63,9)
Индекс продукции RET Reticulocyte production index	14 (8,5–22,9)	9,3 (6,0–13,8)	1,9 (0,6–4,6)	1,6 (0,9–3,1)	1,9 (1,3–2,4)	2,7 (1,2–3,1)	2,3 (1,9–2,9)
LFR, %	56,4 (50–64,4)	61,7 (55,7–66,6)	58,7 (50,1–65,1)	65,5 (62,3–71,7)	65,7 (63,5–70,4)	62,7 (54,2–73,5)	74,6 (72,5–77,2)
MFR, %	21,9 (20,4–24,1)	23 (20,4–25,2)	22,6 (19,6–25,2)	19,6 (17,8–22,6)	20,9 (18,2–21,8)	20,3 (16,7–23,5)	17,5 (15,1–18,8)
HFR, %	20,3 (14,1–26,6)	15,1 (11,3–19,2)	20,0 (9,7–24,9)	14,0 (11,5–18,6)	13,5 (11,1–15,7)	16,6 (8,7–20,4)	7,9 (7,8–8,8)
IRF, %	43,7 (35,6–50)	38,4 (33,7–44,7)	36,5 (35,6–37,4)	34,6 (28,4–37,7)	35,7 (31,3–36,9)	36,4 (33,4–42,6)	25,4 (22,9–27,6)
MicroR, %	1,6 (1,4–2,2)	2 (1,7–2,5)	3,2 (2,6–4,0)	3,7 (2,9–4,2)	3,7 (2,7–4,5)	3,5 (3,2–4,4)	2,8 (2,8–4,4)
MacroR, %	56,7 (52,1–65,3)	51,3 (42,2–58,7)	31,0 (27,3–35,4)	32,0 (20,0–36,4)	19,3 (17,4–25,5)	15,0 (11,8–17,1)	8,5 (8,2–11,7)
Hуро-He, %	1,2 (0,8–2,1)	1,8 (1,2–2,8)	2,2 (1,0–2,8)	1,8 (2,9–4,2)	2,0 (1,6–2,9)	1,6 (1,4–2,2)	1,0 (0,9–1,8)
RBC-He, пг RBC-He, pg	34,7 (33,5–36,7)	33,8 (31,7–35,1)	30,6 (30,3–31,1)	30,1 (28,9–31,6)	30,3 (29,4–30,5)	29,5 (27,9–30,1)	29,4 (27,9–29,9)
RET-HE, пг RET-HE, pg	40,0 (35,7–41,9)	34,7 (28,1–36,9)	33,5 (28,2–36,0)	30,2 (26,0–35,8)	28,4 (25,8–34,8)	32,5 (25,9–37,0)	33,5 (29,2–36,6)
D-He, пг D-He, pg	5,8 (3,5–7,5)	5,6 (3,5–7,2)	5,5 (4,6–6,8)	4,0 (2,5–4,9)	4,3 (2,5–6,2)	3,5 (2,9–5,6)	3,1 (2,1–4,6)

Note. MCV – mean corpuscular volume; MCH – mean corpuscular hemoglobin; MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration; RET – reticulocytes; LFR – low fluorescence reticulocytes; MFR – medium fluorescence reticulocytes; HFR – high fluorescence reticulocytes; IRF – immature reticulocyte fraction; MicroR – microcytic erythrocytes; MacroR – macrocytic erythrocytes; Hуро-He – hypochromic erythrocytes; RBC-He – erythrocyte hemoglobin content; RET-HE – reticulocyte hemoglobin content; D-He – Delta-He, is calculated as the difference between RET-He and RBC-He.

После 2-й недели жизни все дети, включенные в исследование, получали препараты железа. На фоне назначения препаратов железа MicroR, Нуро-Не уменьшались. Также, начиная со 2-й недели жизни и до выписки из стационара показатель RBC-He (соотношение Нуро-Не и Нурег-Не) снижался.

Отмечалась прямая сильная корреляционная связь между RBC-He и MCH в возрасте 29–42 с. ж. ($r = 0,68, p = 0,012$), более 42 с. ж. ($r = 0,78, p = 0,002$) и прямая умеренная корреляционная связь между RBC-He и RET-He в возрасте 29–42 с. ж. ($r = 0,54, p = 0,011$) и более 42 с. ж. ($r = 0,65, p = 0,023$). В возрасте до 28 с. ж. между RBC-He и RET-He статистически значимой корреляции не отмечалось.

Концентрация RET-He у недоношенных новорожденных с ОНМТ в 1-е с. ж. составила 40,0 (35,7–41,9) пг, на 3-й с. ж. отмечалось снижение до 32,7 (28,1–36,9) пг. В течение периода наблюдения концентрация RET-He сначала плавно снижалась, достигая наименьших значений после 3-й недели жизни, – значения составили 28,4 (25,8–34,8) пг, а затем медленно повышались, составляя на момент выписки 33,5 (29,2–36,6) пг. Изменения уровня RET-He сопровождались изменениями уровня RET, при этом уровень гемоглобина не изменялся. При проведении корреляционного анализа были выявлены прямые статистически значимые корреляции между RET-He и MCH на 13–21-е с. ж. ($r = 0,44, p = 0,003$), на 22–28-е с. ж. ($r = 0,44, p = 0,01$), на 29–42-е с. ж. ($r = 0,62, p = 0,004$) и более 42 с. ж. ($r = 0,64, p = 0,036$). Между RET-He и MCHC – прямые статистически значимые корреляции на 13–21-е с. ж. ($r = 0,37, p = 0,015$), на 22–28-е с. ж. ($r = 0,66, p = 0,001$), на 29–42-е с. ж. ($r = 0,56, p = 0,001$) и более 42 с. ж. ($r = 0,60, p = 0,003$). Между RET-He и MCV статистически значимая прямая корреляция средней силы отмечалась лишь в возрасте более 42 с. ж. ($r = 0,58, p = 0,032$). В другие точки исследования значимых корреляций между исследуемыми параметрами не выявлено. Статистически значимых корреляций между гемоглобином и RET-He в исследуемых точках не определялось.

Показатель D-He снижался с 1-х по 42-е с. ж. Динамика D-He в течение исследуемого периода

указывала на развитие и нарастание анемии. Снижение D-He статистически значимо коррелировало со снижением уровня RET-He в возрасте 3 с. ж. ($r = 0,89, p < 0,001$), 7–12 с. ж. ($r = 0,82, p < 0,001$), 13–21 с. ж. ($r = 0,85, p < 0,001$), 22–28 с. ж. ($r = 0,84, p < 0,001$), 29–42 с. ж. ($r = 0,89, p < 0,001$), более 42 с. ж. ($r = 0,94, p < 0,001$).

В таблице 2 представлены показатели железа, ферритина и трансферрина сыворотки крови у недоношенных новорожденных с ОНМТ в течение периода госпитализации.

После 4-й недели жизни отмечалось статистически значимое снижение ферритина у 32% ($n = 21$) детей, $p = 0,028$, RET-He – у 77% ($n = 51$), $p = 0,014$ (таблицы 1, 2).

Мы обнаружили слабую корреляционную связь между RET-He и ферритином ($r = 0,34, p = 0,046$) лишь после 42-х с. ж. у 21 недоношенного новорожденного с ОНМТ с признаками абсолютного ДЖ. Среди новорожденных без признаков абсолютного ДЖ значимых корреляций не выявлено. Между RET-He и уровнем железа ($r = 0,26, p = 0,740$) и RET-He и уровнем трансферрина значимой связи не выявлено ($r = -0,09, p = 0,737$). После 42-х с. ж. не наблюдалось статистически значимой корреляции между уровнями гемоглобина и ферритина ($r = -0,20, p = 0,422$), железа ($r = -0,05, p = 0,825$) и трансферрина ($r = 0,07, p = 0,805$).

У 21 ребенка отмечались признаки абсолютного ДЖ в возрасте более 4 недель жизни, значения RET-He составили $< 30,6$ пг. У 2 детей наблюдались признаки железодефицитной анемии перед выпиской из стационара в возрасте 6 недель жизни.

С помощью ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи наличия абсолютного ДЖ и значения RET-He в возрасте старше 42 с. ж. у недоношенных новорожденных с ОНМТ, мы определили оптимальное разделяющее значение RET-He, равное 28,4 пг, обладающее наилучшим сочетанием чувствительности (83,3%) и специфичности (93,7%) (рисунок 2).

Площадь под ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи наличия абсолютного ДЖ и RET-He в возрасте более 42 с. ж., составила $0,927 \pm 0,057$ с 95% доверительным интервалом 0,815–0,996.

Таблица 2

Концентрации сывороточного железа, ферритина и трансферрина у недоношенных новорожденных с ОНМТ. Me (IQR)

Table 2

Serum iron, ferritin and transferrin concentrations in preterm newborns with VLBW. Me (IQR)

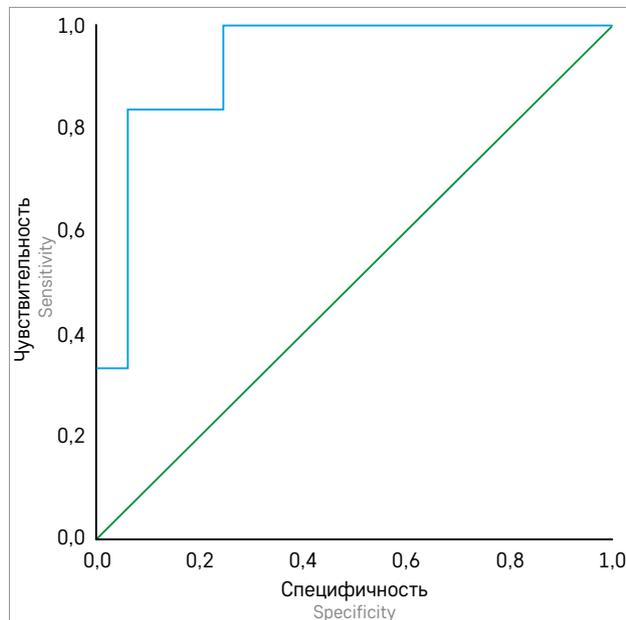
Показатель Parameter	Возраст пациентов, с. ж. Age of patients, days of life				
	7–12	13–21	22–28	29–42	> 42
Железо, ммоль/л Iron, mmol/L	17,6 (8,7–18,4)	17,7 (9,4–20,6)	15,6 (9,2–16,4)	11,7 (8,7–20,6)	17,5 (10,2–20,9)
Ферритин, мкг/л Ferritin, µg/L	176,6 (135,9–294,0)	143,9 (71,2–219,5)	105,5 (86,6–190,9)	43,7 (27,9–96,4)	37,4 (23,1–105,7)
Трансферрин, мг/дл Transferrin, mg/dL	185,9 (166,9–214,9)	211,8 (169,6–245,0)	199,7 (173,6–233,2)	223,3 (202,3–232,2)	213,9 (191,2–222,9)

Рисунок 2

ROC-кривая, соответствующая взаимосвязи наличия абсолютного ДЖ и значения RET-He (пг) после 42 с. ж. у недоношенных новорожденных с ОНМТ

Figure 2

The ROC-curve corresponding to the relationship between the presence of absolute iron deficiency and the RET-He (pg) value after 42 days of life in premature newborns with VLBW



Полученная модель была статистически значимой ($p = 0,003$).

Площади под кривой для определения ДЖ были выше для RET-He в возрасте более 42 с. ж. по сравнению с ферритином (0,927 против 0,752), железом (0,927 против 0,675) и MCV (0,927 против 0,642).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значительный интерес представляют работы по изучению показателей крови, отражающих состояние эритропоэза, а также особенностей обмена железа у недоношенных новорожденных. Клиническая лабораторная диагностика таких состояний, как ДЖ, может быть проведена с использованием современных автоматических гематологических анализаторов. Такой подход демонстрирует, что важно уделять внимание каждому параметру результата развернутого гематологического анализа. Традиционно оцениваются такие показатели, как MCV, MCH, MCHC, а также уровень ферритина, железа и трансферрина сыворотки крови. Однако в ряде случаев для исследования метаболизма железа данные маркеры могут быть малоинформативными. Показатели MCV, MCH, MCHC, как правило, изменяются не сразу и являются неспецифическими признаками ДЖ, особенно у недоношенных новорожденных. Если же говорить о биохимических маркерах, то низкая концентрация ферритина однозначно указывает на ДЖ, в то время

как его нормальная или повышенная концентрации не позволяют однозначно утверждать об избытке железа. При инфекционных заболеваниях концентрация ферритина может быть повышена даже при ДЖ [4, 5]. Так, в исследовании M. Ochiai и соавт. [6], целью которого было изучение обмена железа и клинических особенностей у детей с ОНМТ при рождении, множественный логистический анализ выявил 3 сопутствующих фактора гиперферритинемии (значения ферритина более 500 нг/мл) у недоношенных детей с массой тела при рождении менее 1500 г, к которым относились наличие сепсиса, бронхолегочной дисплазии средней или тяжелой формы, а также лигирование гемодинамически значимого открытого артериального протока.

Определение растворимого рецептора трансферрина (sTfR) является частью диагностики анемии в сложных случаях. Значение sTfR оценивается совместно с сывороточным трансферрином, сывороточным ферритином и количеством RET. Значение sTfR можно использовать для оценки текущих потребностей в железе, в то время как концентрация ферритина отражает имеющиеся запасы железа. Оба значения вместе дают более точную картину. Однако метод измерения sTfR доступен не во всех лабораториях и практически не используется в рутинной клинической практике, поскольку является дорогостоящим. В исследовании A.K. Tiwari и соавт. (2018) среди 501 донора крови было обнаружено, что RET-He обладает способностью, сопоставимой с sTfR, идентифицировать скрытый ДЖ. Параметры sTfR и RET-He выявили скрытый ДЖ у 148 и 135 доноров соответственно. RET-He имел чувствительность 92,7%, специфичность 97,16%, положительную прогностическую ценность 93,1% и отрицательную прогностическую ценность 96,3% по сравнению с sTfR. Сывороточный ферритин, общая железосвязывающая способность и сывороточное железо имели сравнительно более низкую чувствительность – 87,16%, 79,7% и 77,7% соответственно [7].

В случаях нормальной или повышенной концентрации ферритина определение RET-He (как способа прямого измерения уровня железа, которое непосредственно используется для биосинтеза гемоглобина) может позволить выяснить, достаточно ли железа поступает для эритропоэза. Поэтому RET-He следует измерять вместе с ферритином. Высокий или нормальный уровень ферритина в сочетании с низким показателем RET-He может указывать на функциональный ДЖ, а низкий уровень ферритина с низким RET-He свидетельствует о классическом ДЖ. Измерение RET-He предоставляет информацию о текущей биологической доступности железа – низкий показатель означает ДЖ или биологическую недоступность железа для эритропоэза.

RET-He может быть определен в течение нескольких минут в капиллярной и/или венозной крови с помощью развернутого клинического анализа крови на высокотехнологичном гематологическом анализаторе, что сокращает флеботомические потери крови и является относительно низкочастотным методом в отличие от определения железа, ферритина, трансферрина, а также sTfR в сыворотке крови. RET-He не зависит от острой фазы воспалительной реакции, что имеет важное значение при проведении дифференциальной диагностики ДЖ.

Согласно отечественным исследованиям, определение RET-He используется при диагностике железодефицитных состояний в педиатрической практике. Диагностика ДЖ у детей представляет сложности при сопутствующих заболеваниях, когда биохимические показатели обмена железа могут оказаться недостаточно информативными. Показатели RET-He и D-He позволяют раньше выявить истинный ДЖ и не зависят от сопутствующей патологии [2, 8, 9]. В работе К.И. Пшеничной и соавт. [10] определялись RET-He и D-He в клиническом анализе крови на гематологических анализаторах Sysmex XT-4000 и Sysmex XN-9000 (Япония) у 24 детей в возрасте от 1 года до 18 лет: абсолютный латентный ДЖ наблюдался у 5 пациентов, железодефицитная анемия – у 19. RET-He оказался сниженным в среднем до $24,2 \pm 3,5$ пг. Через 2 нед после начала лечения при тенденции к повышению других показателей анализа крови RET-He повысился до $26,0 \pm 2,9$ пг. Показатель D-He, сниженный исходно до $2,9 \pm 0,9$ пг, вырос до $6,3 \pm 3,4$ пг. Авторы сделали вывод о том, что показатели RET-He и D-He при ДЖ являются информативными, экономичными и доступными, не требующими дополнительного объема крови.

Мы провели оценку стандартного профиля гематологических тестов, а также функционального состояния RET у новорожденных с ОНМТ и выявили, что после 2-й недели жизни у 23% ($n = 15$) новорожденных отмечались признаки ДЖ (снижение сывороточного железа и ферритина), снижение MacroR, повышение MicroR, повышение Hуро-He при нормальных значениях гемоглобина и эритроцитов. Следует отметить, что перечисленные показатели могут быть измерены без дополнительного объема флеботомий и могут выявлять микроцитарные и гипохромные нарушения, даже когда показатели эритроцитов в норме.

На фоне назначения препаратов железа показатели MicroR, Hуро-He снижались, что позволяет говорить о возможности их использования как дополнительного критерия при оценке эффективности терапии препаратами железа и подбора оптимальной дозы.

D-He является расчетным показателем, который легко измерить в повседневной практике, его

значения у взрослого человека находятся в положительном диапазоне, поскольку содержание гемоглобина в RET выше, чем в эритроцитах [9]. Значения D-He ниже нормального диапазона на протяжении длительного времени указывают на развитие анемии [11]. D-He напрямую отражает участие железа в эритропоэзе независимо от запасов железа в организме, в то время как RET-He – среднее значение гемоглобина вновь образованных незрелых RET [12]. D-He и RET-He не зависят от сопутствующих воспалительных состояний, демонстрируют быструю реакцию на изменение доступности железа и отражают функциональную доступность железа для эритропоэза в течение 1–2 дней [13, 14]. В нашем исследовании у новорожденных с ОНМТ отмечалось плавное снижение D-He в течение периода от рождения до выписки из стационара. Среди ранних признаков ДЖ у недоношенных новорожденных с ОНМТ по данным оценки гематологических параметров в клиническом анализе крови определено статистически значимое снижение RET-He, D-He, RBC-He и увеличение MicroR и Hуро-He. При проведении корреляционного анализа между традиционно используемыми маркерами ДЖ и показателями функционального состояния RET отмечались значимая прямая корреляционная связь между RET-He и MCH, RET-He и MCHC, RET-He и RBC-He, RET-He и D-He и обратная корреляционная связь между RET-He и Hуро-He ($p < 0,05$). Между RET-He и железом, RET-He и трансферрином, как и между RET-He и гемоглобином, значимых корреляций в исследуемых точках выявлено не было. У 21 недоношенного новорожденного с ОНМТ с признаками абсолютного ДЖ после 42 с. ж. наблюдалась слабая корреляционная связь между RET-He и ферритином ($r = 0,34$, $p = 0,046$). Полученные результаты указывают на то, что RET-He, D-He являются более ранними маркерами ДЖ у недоношенных новорожденных с ОНМТ. При этом уменьшение RET-He по сравнению со значениями D-He происходило с некоторым опозданием: значимые изменения со стороны D-He наблюдались уже после 2-й недели жизни, в то время как RET-He значимо снижался после 3–4 недель жизни. На фоне назначения препаратов железа отмечалась положительная динамика со стороны как D-He, так и RET-He. Таким образом, при проведении терапии препаратами железа появляется возможность ориентироваться на значения D-He и RET-He вместо сывороточных маркеров, что дает возможность раньше обнаружить и оценить эффективность терапии.

Обращала на себя внимание также сильная прямая корреляционная связь между RET-He и D-He, обратная корреляционная связь между RET-He и Hуро-He, начиная с 3-х с. ж. и до выписки из стационара. Вероятно, данные показатели являются наиболее взаимосвязанными и отражают латентный ДЖ.

Ввиду недостаточной информированности врачей, а также отсутствия стандартизированных пороговых значений RET-He рутинное использование RET-He и других показателей функционального состояния RET в клинической практике ограничено. Нормальный диапазон RET-He у взрослых составляет 28–35 пг. В литературе представлены немногочисленные исследования, посвященные определению RET-He и других показателей функционального состояния RET у недоношенных новорожденных. В исследовании R.T. Al-Ghanaim и соавт. [15] были описаны значения RET-He у недоношенных новорожденных с ОНМТ при рождении. В первые 24 ч жизни уровень RET-He составлял $31,8 \pm 1,1$ пг (mean \pm SD). Затем отмечалось снижение до $28,3 \pm 1,1$ пг к 2–3-м с. ж., после чего уровень RET-He оставался устойчивым – $28,4 \pm 0,5$ пг. Значения RET-He у недоношенных детей старше 4 с. ж. были существенно ниже, чем у доношенных новорожденных, детей более старшего возраста и взрослых – $31,6 \pm 0,11$ пг, $32,0 \pm 0,12$ пг и $33,0 \pm 0,13$ пг соответственно. L. Lorenz и соавт. [16] провели исследование, целью которого было установление диапазона RET-He у недоношенных и доношенных детей в течение первых 24 ч жизни и определение антенатальных факторов, влияющих на этот показатель. У недоношенных детей ГВ < 30 недель ($n = 55$) уровень RET-He составил (mean \pm SD) $30,7 \pm 3,0$ пг, у недоношенных детей ГВ 30–36 недель ($n = 241$) – $31,2 \pm 2,6$ пг и у доношенных новорожденных ($n = 216$) – $32,0 \pm 3,2$ пг. Наиболее низкое значение RET-He (2,5-й перцентиль) во всех группах составило 25 пг вне зависимости от ГВ. Кроме того, были обнаружены только слабые/отсутствующие корреляции между RET-He и С-реактивным белком ($r = 0,18$), интерлейкином-6 ($r = 0,03$) и рН артерии пуповины ($r = -0,07$), а также ГВ ($r = 0,18$). Наблюдались незначительные различия в RET-He в зависимости от способа родоразрешения (влагалищные роды – $32,3 (3,2)$ пг, кесарево сечение – $31,4 (3,0)$ пг). В следующем исследовании L. Lorenz и соавт. [17] проанализировали 805 образцов крови, полученных от 207 доношенных и 295 недоношенных новорожденных. RET-He снижался на 1,5 пг/день (коэффициент регрессии (95% доверительный интервал) $-1,5$ (от $-1,8$ до $-1,2$) пг, $p < 0,0001$). Это снижение было более значительным у недоношенных детей (коэффициент регрессии $-2,2$ (от $-2,6$ до $-1,8$) пг, $p < 0,0001$), чем у доношенных детей (коэффициент регрессии $-0,8$ (от $-1,3$ до $-0,2$) пг, $p < 0,01$). Авторы сделали вывод, что RET-He снижался в течение первых дней после рождения. В нашем исследовании концентрация RET-He у недоношенных новорожденных с ОНМТ в 1-е с. ж. составила $40,0 (35,7–41,9)$ пг, на 3-и с. ж. отмечалось снижение до $32,7 (28,1–36,9)$ пг, на 7–12-е с. ж. – до $33,5 (28,2–36,0)$ пг,

на 13–21-е с. ж. – до $30,2 (26,0–35,8)$ пг, на 22–28-е с. ж. – до $28,4 (25,8–34,8)$ пг, на 29–42-е с. ж. – до $32,5 (25,9–37,0)$ пг. В течение периода наблюдения RET-He сначала плавно снижался, достигая наименьших значений после 3-й недели жизни. Отмечалось статистически значимое снижение RET-He у 77% ($n = 51$) детей, $p = 0,014$. На фоне приема препаратов железа в профилактических дозах RET-He медленно увеличивался, составляя на момент выписки $33,5 (29,2–36,6)$ пг. Значения RET-He показали медленную тенденцию к росту при энтеральном приеме препаратов железа после первоначального снижения, что позволяет предположить его возможное использование в качестве маркера для мониторинга терапии препаратами железа у новорожденных.

Референтные значения у новорожденных детей, в особенности недоношенных, описаны в немногочисленных исследованиях. Поэтому, несмотря на малый объем выборки нашей работы, что, безусловно, является ее ограничением, мы считаем, что полученные данные вносят существенный вклад в описание и анализ показателей эритропоза периферической крови у недоношенных новорожденных с ОНМТ. Согласно нашему исследованию, изменения уровня RET-He сопровождались изменениями уровня RET, при этом уровень гемоглобина не изменялся. В возрасте более 42 с. ж. при значениях RET-He, равных или менее 28,4 пг, с чувствительностью 83,3% и специфичностью 93,7% прогнозировался высокий риск наличия абсолютного ДЖ. Иными словами, у недоношенных новорожденных с ОНМТ в возрасте старше 42 с. ж. при значениях RET-He, равных или менее 28,4 пг, доступность железа для синтеза гемоглобина является недостаточной. Площади под кривой для определения ДЖ были выше для RET-He в возрасте более 42 с. ж. по сравнению с ферритином (0,927 против 0,752), железом (0,927 против 0,675) и MCV (0,927 против 0,642).

Таким образом, RET-He является информативным маркером скрытого ДЖ у недоношенных новорожденных с ОНМТ в возрасте более 6 недель и может превосходить по диагностической значимости ферритин, железо и MCV. Однако только комплексная оценка всех показателей позволит наиболее рано и точно определить ДЖ, а также подобрать оптимальный режим терапии каждому ребенку индивидуально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранними диагностическими признаками ДЖ у недоношенных новорожденных с ОНМТ являлись снижение RET-He, D-He, RBC-He, повышение MicroR и Нуро-He. Мы предполагаем, что в клинической

практике у недоношенных новорожденных с ОНМТ в возрасте более 42 с. ж. можно ориентироваться на значения RET-He, равные или менее 28,4 пг, как дополнительный критерий ДЖ (чувствительность 83,3% и специфичность 93,7%). Благодаря определению RET-He, а также D-He, Нуро-He, можно с минимальными затратами значительно раньше обнаружить признаки латентного ДЖ, не увеличивая при этом флеботомические потери крови у недоношенных новорожденных с ОНМТ.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведенное исследование не исчерпывает всей глубины комплексной программы профилактики и лечения анемии недоношенных. В качестве перспектив дальнейшей разработки темы мы планируем провести оценку изменений RET-He и других показателей функционального состояния RET в

клиническом анализе периферической крови у недоношенных новорожденных с ОНМТ, получавших и не получавших терапию рекомбинантным человеческим эритропоэтином.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Sharafutdinova D.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9626-5481>

Balashova E.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3741-0770>

Sukhova Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9657-5375>

Kirtbaya A.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8157>

Ryndin A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5560-8759>

Ivanets T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7990-0276>

Ionov O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4153-133X>

Литература

- Christensen R.D., Bahr T.M., Ward D.M. Iron deficiency in newborn infants: global rewards for recognizing and treating this silent malady. *Newborn* (Clarksville) 2022; 1 (1): 97–103. DOI: 10.5005/jp-journals-11002-0021
- Балашова Е.А., Мазур Л.И., Перстенева Н.П. Диагностическая ценность содержания гемоглобина в ретикулоцитах при установлении дефицита железа у доношенных детей первого года жизни. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2020; 65 (3): 44–52. DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-3-44-52
- Балашова Е.А., Шарифутдинова Д.Р., Нароган М.В., Пучкова А.А., Дегтярева А.В., Сапун О.И. и др. Ранняя анемия недоношенных (клинические рекомендации). *Неонатология: новости, мнения, обучение* 2021; 9 (3): 47–61. DOI: 10.33029/2308-2402-2021-9-3-47-61
- Buttarelli M., Pajola R., Novello E., Mezzapelle G., Plebani M. Evaluation of the hypochromic erythrocyte and reticulocyte hemoglobin content provided by the Sysmex XE-5000 analyzer in diagnosis of iron deficiency erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54 (12): 1939–45.
- Mehta S., Goyal L.K., Kaushik D., Gulati S., Sharma N., Harshvardhan L., Gupta N. Reticulocyte hemoglobin vis-a-vis serum ferritin as a marker of bone marrow iron store in iron deficiency anemia. *J Assoc Physicians India* 2016; 64: 38–42.
- Ochiai M., Kurata H., Inoue H., Tanaka K., Matsushita Y., Fujiyoshi J., et al. An Elevation of Serum Ferritin Level Might Increase Clinical Risk for the Persistence of Patent Ductus Arteriosus, Sepsis and Bronchopulmonary Dysplasia in Erythropoietin-Treated Very-Low-Birth-Weight Infants. *Neonatology* 2017; 111 (1): 68–75.
- Tiwari A.K., Bhardwaj G., Arora D., Aggarwal G., Pabbi S., Dara R.C., et al. Applying newer parameter Ret-He (reticulocyte haemoglobin equivalent) to assess latent iron deficiency (LID) in blood donors—study at a tertiary care hospital in India. *Vox Sang* 2018; 113 (7): 639–46.
- Барановская И.Б., Лузакова И.А., Напсо Л.И., Проскуряков М.Т., Ригер Н.А. Гемоглобин ретикулоцитов – дополнительный маркер диагностики ранней стадии железодефицитных состояний. [Электронный ресурс]. URL: http://www.rusnauka.com/8_NPE_2007/Medicine/20914.doc.htm (дата обращения 22.06.2023).
- Weimann A., Cremer M., Hernáiz-Driever P., Zimmermann M. Delta-He, Ret-He and a New Diagnostic Plot for Differential Diagnosis and Therapy Monitoring of Patients Suffering from Various Disease-Specific Types of Anemia. *Clin Lab* 2016; 62: 667–77.
- Пшеничная К.И., Ивашкина Т.М., Зайдина М.В. Определение гемоглобина ретикулоцитов – современный подход к диагностике железодефицитных состояний у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (3): 32–5. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-32-35
- Теряева Н.Б., Кван О.К., Гаджиева О.А., Баширян Б.А. Динамический контроль лабораторных показателей при коррекции железодефицитных состояний у нейрохирургических больных. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67 (4): 500–9. DOI: 10.35754/0234-5730-2022-67-4-500-509.
- Van Pelt J.L., Klatte S., Hwandih T., Barcaru A., Riphagen I.J., Linssen J., Bakker S.J.L. Reference Intervals for Sysmex XN Hematological Parameters as Assessed in the Dutch Lifelines Cohort. *Clin Chem Lab Med* 2022; 60: 907–20.
- Uçar M.A., Falay M., Dağdas S., Ceran F., Uurlu S.M., Özet G. The Importance of RET-He in the Diagnosis of Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia and the Evaluation of Response to Oral Iron Therapy. *J Med Biochem* 2019; 38: 496–502.
- Zuther M., Rübsam M.L., Zimmermann M., Zarbock A., Hönemann C. Improved Diagnosis of Iron Deficiency Anemia in the Critically Ill via Fluorescence Flowcytometric Hemoglobin Biomarkers. *Cells* 2022; 12 (1): 140. DOI: 10.3390/cells12010140.
- Al-Ghananim R.T., Nalbant D., Schmidt R.L., Cress G.A., Zimmerman M.B., Widness J.A. Reticulocyte Hemoglobin Content During the First Month of Life in Critically Ill Very Low Birth Weight Neonates Differs From Term Infants, Children, and Adults. *J Clin Lab Anal* 2016; 30 (4): 326–34.
- Lorenz L., Peter A., Arand J., Springer F., Poets C.F., Franz A.R. Reference Ranges of Reticulocyte Haemoglobin Content in Preterm and Term Infants: A Retrospective Analysis. *Neonatology* 2017; 111 (3): 189–94. DOI: 10.1159/000450674
- Lorenz L., Peter A., Arand J., Springer F., Poets C.F., Franz A.R. Reticulocyte Haemoglobin Content Declines More Markedly in Preterm than in Term Infants in the First Days after Birth. *Neonatology* 2017; 112 (3): 246–50. DOI: 10.1159/000477124

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 15.05.2023
Принята к печати 26.06.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-156-165

Возрастные изменения характера нарушений функции тромбоцитов у пациентки с *SLFN14*-связанной макротромбоцитопенией

Е.Ю. Рашевская¹, Д.М. Полохов², Д.В. Федорова², А.А. Игнатова², Е.А. Пономаренко², Е.В. Райкина², И.В. Мерсиянова², А.В. Полетаев², Е.В. Трухина², С.А. Плясунова², П.А. Жарков², М.А. Пантелеев²⁻⁴

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

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

³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Контактная информация:

Рашевская Елена Юрьевна,
врач-ординатор по специальности
«гематология» ФГАОУ ВО РНИМУ
им. Н.И. Пирогова Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Островитянова, 1
E-mail: elena.rashevskaya98@mail.ru

Нарушение свертываемости крови тромбоцитарного типа-20 является редкой наследственной тромбоцитопенией, вызываемой мутациями в гене *SLFN14*. Нами наблюдалась пациентка в возрасте с 17 до 19 лет с мутацией *SLFN14*, макротромбоцитопенией, тяжелым геморрагическим синдромом и отягощенным семейным анамнезом. В ходе 3-летнего обследования наблюдалась тенденция к частичной нормализации количества (с 47 до 82 × 10⁹/л) и морфологии тромбоцитов. Уменьшались размер, гранулярность, плотность рецепторов гликопротеина (ГП) Ib/V/IX и ГП IIb/IIIa мембраны тромбоцитов. Активация ГП IIb/IIIa была нарушена и положительной динамики не имела. Показатели плотных гранул были стабильно повышены. Показатели α-гранул (по P-селектину) не отличались от значений контрольной группы. Доля прокоагулянтных фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов была повышена в покое, способность образовывать прокоагулянтные тромбоциты при активации была ослаблена. У пациентки по мере взросления наблюдалось облегчение проявлений геморрагического синдрома в сочетании с тенденцией к нормализации лабораторных показателей тромбоцитов. Все исследования проводились после получения письменного информированного согласия пациентки и ее родителей в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Ключевые слова: BDPLT-20, *SLFN14*, наследственная макротромбоцитопения, геморрагический синдром, проточная цитометрия

Рашевская Е.Ю. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 156–65. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-156-165

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 15.05.2023

Accepted 26.06.2023

Age-dependent changes in platelet function of a patient with *SLFN14*-related macrothrombocytopenia

E.Yu. Rashevskaya¹, D.M. Polokhov², D.V. Fyodorova², A.A. Ignatova², E.A. Ponomarenko², E.V. Raykina², I.V. Mersyanova², A.V. Poletayev², E.V. Trukhina², S.A. Plyasunova², P.A. Zharkov², M.A. Panteleev²⁻⁴

¹The N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴The M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Platelet-type bleeding disorder-20 is a rare inherited thrombocytopenia caused by mutations in the *SLFN14* gene. We report a case of a female patient with *SLFN14* mutation, macrothrombocytopenia, severe hemorrhagic syndrome and a positive family history who was followed up from the age of 17 to 19. The 3-year follow-up showed a tendency towards partial normalization of platelet counts (from 47 to 82 × 10⁹/L) and morphology. Platelet size and granularity as well as the density of glycoprotein (GP) membrane receptors such as GP Ib/V/IX and GP IIb/IIIa decreased. GP IIb/IIIa activation was impaired and there were no positive changes over time. The dense granules indicators were stably elevated. The parameters of α-granules (assessed by P-selectin expression) did not differ from the control group. The proportion of procoagulant phosphatidylserine-positive platelets at rest was increased and the potential to form procoagulant platelets upon activation was reduced. As the patient grew older, her bleeding disorder symptoms abated and she showed a tendency towards normalization of platelet laboratory parameters. All investigations were performed after obtaining informed consent from the patient and her parents in accordance with the Declaration of Helsinki.

Key words: BDPLT-20, *SLFN14*, inherited thrombocytopenia, hemorrhagic syndrome, flow cytometry

Rashevskaya E.Yu., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 156–65. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-156-165

Нарушение свертываемости крови тромбоцитарного типа-20 (platelet-type bleeding disorder-20, BDPLT-20) вызывается гетерозиготной мутацией в гене *SLFN14* на хромосоме 17q12

(OMIM #616913) и относится к наследственным тромбоцитопениям (НТ). НТ характеризуются высокой вариабельностью тромбоцитопении и склонностью к кровотечениям, выявляемой с рождения. НТ – это

редкие заболевания, распространенность которых оценивается в 2,7 на 100 000. Однако эта цифра является ориентировочной, потому что НТ часто ошибочно диагностируются как иммунная тромбоцитопения [1]. По данным недавнего исследования по оценке частоты встречающихся мутаций в генах, связанных с нарушениями тромбоцитов (52% из которых были связаны с НТ), было установлено, что в общей популяции 0,329% обследованных имели клинически значимую мутацию [2]. Распространенность мутации *SLFN14* не определена.

Ранее были описаны 13 пациентов из 5 семей с мутациями *SLFN14* и проявлениями кровоточивости различной степени выраженности [3–6]. S.J. Fletcher и соавт. сообщили о 9 пациентах из 3 неродственных семей, у которых тесты агрегометрии тромбоцитов показали снижение агрегации в ответ на аденозиндифосфат (АДФ), коллаген, но давали нормальную реакцию на арахидоновую кислоту. Электронная микроскопия тромбоцитов показала нормальные α -гранулы, но значительное уменьшение количества плотных гранул по сравнению с контролем, что сопровождалось снижением секреции аденозинтрифосфата по данным люмиагрегометрии. У многих пациентов наблюдалось увеличение размера тромбоцитов [3].

C. Magsoni и соавт. сообщили о 3 членах итальянской семьи с макротромбоцитопенией и умеренным геморрагическим синдромом [4]. Известно, что белок *SLFN14* является эндорибонуклеазой, регулирующей синтез белков, ответственных за расщепление РНК, а также регулятором тромбоцитопоэза [7]. Исследование предшественников мегакариоцитов у пациентов показало нарушение созревания протромбоцитов [4].

Нами наблюдалась пациентка в возрасте с 17 до 19 лет с мутацией *SLFN14*, макротромбоцитопенией, тяжелым геморрагическим синдромом и отягощенным семейным анамнезом. Ранее мы подробно описывали результаты первичного обследования данной пациентки. Тромбоциты были гетерогенны по размеру, с преобладанием крупных вакуолизированных форм, с нарушением способности к адгезии и агрегации, активации гликопротеина (ГП) IIb/IIIa, диффузным распределением β_1 -тубулина цитоскелета и рецептора CD63, ослаблением внутриклеточной мобилизации кальция при стимуляции TRAP и CRP [8]. Остается не изученным вопрос о возможных возраст-зависимых особенностях течения заболевания. Считается, что интенсивность кровоизлияний при первичных нарушениях гемостаза, в том числе спонтанных носовых кровотечениях, может уменьшаться или даже исчезать после полового созревания [9].

Цель данной работы заключалась в выявлении возможных связей между уменьшением тяжести

кровоточивости и характеристиками тромбоцитов при взрослении пациентки с *SLFN14*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования проводились после получения письменного информированного согласия пациентки и ее родителей в соответствии с Хельсинкской декларацией.

В НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с 2016 по 2019 г. наблюдалась пациентка с макротромбоцитопенией, гетерозиготной мутацией *SLFN14* с.655A> G, геморрагическим синдромом и отягощенным семейным анамнезом по отцовской линии. В течение 3 лет проводились ежегодные обследования, включающие оценку морфологии тромбоцитов методом оптической микроскопии и исследование функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии (ПЦ). Результаты углубленного изучения системы гемостаза при первом обращении в возрасте 17 лет были опубликованы ранее [8].

Оптическая микроскопия

Для приготовления мазка крови использовали ЭДТА-антикоагулированную кровь. Мазок крови окрашивался с использованием общепринятой методики по Романовскому–Гимзе.

Проточная цитометрия

ПЦ выполнялась по описанной ранее методике [10–12]. Изучался маркерный состав тромбоцитов в состоянии покоя и после активации смесью TRAP-6 (агонист рецептора PAR-1) и CRP (агонист ГП VI). Оценивались количество тромбоцитов, их морфология по FSC (размер) и SSC (гранулярность). Изучались рецепторы мембраны тромбоцитов: CD42b (субъединица Ib) рецепторного комплекса ГП Ib/V/XI; CD61 (субъединица IIIa) рецепторного комплекса ГП IIb/IIIa; связывание PAC-1 (выявление активированной формы ГП IIb/IIIa); CD62p (P-селектин) как маркер дегрануляции α -гранул. Объем и высвобождение плотных гранул оценивались по флуоресценции загруженного мепакрина. Фосфатидилсерин-положительные (ФС⁺) прокоагулянтные тромбоциты определялись по аннексину V.

Для оценки активационных изменений морфологических характеристик тромбоцитов были использованы расчетные индексы FSC и SSC в покое/после активации, описывающие уменьшение размера и гранулярности тромбоцитов [10–12]. Использование отношения в покое/после активации для рецепторов, гранул и ФС позволило интегрально и персонализировано оценить эффективность работы механизмов изменения фенотипа тромбоцитов независимо от

размера клеток. Относительные значения индексов позволили исключить ложную интерпретацию абсолютных значений в тех случаях, когда при активации абсолютные значения формально находились в пределах диапазона контрольной группы (КГ), но в действительности у пациента должных изменений фенотипа тромбоцитов не происходило.

Для оценки возраст-зависимых изменений использовались значения КГ из 6 здоровых подростков с медианой возраста 17 лет, описанные ранее [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациентку с рождения беспокоили проявления геморрагического синдрома: длительные кровотечения из мест инъекции, при прорезывании зубов, носовые кровотечения, требующие терапии. В 10 лет диагностированы гемартрозы коленных суставов, с 12 лет – полименорея. Неоднократно возникали длительные анемизирующие кровотечения, требующие госпитализации в реанимационное отделение. Проводились заместительные трансфузии компонентами крови и терапия препаратами факторов свертывания. Таким образом, к 17 годам тяжесть геморрагического синдрома пациентки анамнестически была оценена в 20 баллов по шкале Pediatric bleeding questionnaire (PBQ) (таблица 1). В возрасте 18 лет произошел гемартроз плечевого сустава, спровоцированный физической нагрузкой. В связи с достижением совершеннолетия тяжесть геморрагического синдрома у пациентки повторно оценивалась с использованием шкалы ISTH-SSC Bleeding Assessment Tool (BAT) [13] и составила также 20 баллов. Однако с возрастом было отмечено ослабление геморрагического синдрома: в 19 лет пациентка не предъявляла жалобы на тяжелые проявления геморрагического синдрома, приводящие к социальной дезадаптации. Ранее S.J. Fletcher и соавт. сообщили о кровотечениях от легкой до тяжелой степени тяжести (5–22 балла по BAT) у пациентов с *SLFN14* [3]. В работе C. Magsoni и соавт. описывались пациенты с менее выраженным геморрагическим синдромом (2–9 баллов по шкале BAT) [4].

По данным семейного анамнеза у матери пациентки проявлений геморрагического синдрома не было, отец страдал от тяжелых эпизодов носового кровотечения, которые требовали госпитализации в детском и подростковом возрасте. Также сообщалось о гемартрозе коленного сустава и тромбоцитопении легкой степени тяжести ($100\text{--}130 \times 10^9/\text{л}$). Однако проявления геморрагического синдрома ослабли к 20–25 годам. Матери пациентки было проведено молекулярно-генетическое исследование, однако мутация в гене *SLFN14* не была выявлена. Отец пациентки отказался от генетического тестирования.

Таблица 1
Оценка тяжести кровотечения по шкалам PBQ и BAT ITSH

Table 1
Assessment of the severity of bleeding using the PBQ scale and the ITSH BAT

Симптомы Symptoms	Шкала, баллы Score	
	PBQ	BAT
Носовые кровотечения Epistaxis	3	3
Кожный геморрагический синдром Cutaneous bruising	2	2
Кровотечения из незначительных ран Bleeding from minor wounds	4	4
Кровотечения из слизистой ротовой полости Oral cavity bleeding	4	4
Кровотечения из желудочно-кишечного тракта Gastrointestinal bleeding	–	–
Гематурия Haematuria	Не оценивается Not subject to evaluation	–
Кровотечения при удалении зубов Dental extractions	–	–
Кровотечения при хирургических операциях Surgery	4	4
Меноррагии Menorrhagia	1	1
Послеродовые кровотечения Post-partum haemorrhage	Не оценивается Not subject to evaluation	–
Межмышечные гематомы Muscle haematomas	–	–
Гемартрозы Haemarthrosis	2	2
Кровотечения в ЦНС CNS bleeding	–	–
Другие кровотечения: после циркумцизии, из пуповинного остатка, кефалогематома, макрогематурия, после венеопункций, субконъюнктивальные кровоизлияния Other bleeding problems: following circumcision, umbilical stump bleeding, cephalohaematoma, macroscopic haematuria, post-venepuncture, conjunctival haemorrhage.	–	–
Всего Total	20	20

Примечание. ЦНС – центральная нервная система.
Note. CNS – central nervous system.

Оптическая микроскопия

Тромбоциты пациентки характеризовались высокой гетерогенностью размера и гранулярности с преобладанием крупных вакуолизированных форм (рисунки 1). За время наблюдения с 17 до 19 лет уменьшились средний диаметр и площадь тромбоцитов. В 2 раза снизилась доля тромбоцитов диаметром $> 5,0$ мкм (таблица 2). Количество гипо- и агранулярных форм тромбоцитов в возрасте 17 лет составляло до 50%, к 19 годам снизилось до 22,4%, демонстрируя тенденцию к нормализации размера и гранулярности тромбоцитов.

Наблюдалась тенденция к снижению фракции незрелых (ретикулярных) тромбоцитов (IPF) по мере взросления пациентки с 9,7 до 8,6% (норма 1,4–4,6%) (таблица 2), что коррелирует с увеличением количества и уменьшением размера тромбоцитов, однако

данный показатель все равно оставался выше референтных значений для возраста пациентки [14].

Проточная цитометрия

У пациентки за время наблюдения с 17 до 19 лет отмечалась тромбоцитопения с тенденцией к восстановлению количества тромбоцитов с 47 до $82 \times 10^9/\text{л}$ (таблица 3). Метод ПЦ показал гетерогенность тромбоцитов пациентки по размеру и гранулярности, определявшихся по светорассеянию (рисунок 2, таблица 3).

В период наблюдения размер (рисунок 2А, Б) и гранулярность (рисунок 2Г, Д) тромбоцитов в покое и после активации были повышены. Однако с возрастом пациентки размер и гранулярность в покое уменьшались, приближаясь к верхним значениям КГ. После активации наблюдалась тенденция к увеличению размера тромбоцитов (рисунок 2Б). В норме, напротив, происходит контракция тромбоцитов после активации за счет сокращения актомиозина и других динамических цитоскелетных процессов [15]. Показатели гранулярности не изменялись при активации (рисунок 2Д) относительно значений в покое (рисунок 2Г) в течение всего периода наблюдения.

Рисунок 1

Морфология тромбоцитов

Панель А – крупные вакуолизованные тромбоциты пациентки; панель Б – тромбоциты здорового добровольца

Figure 1

Platelet morphology

Panel A – large vacuolated platelets of the patient; panel B – platelets of a healthy volunteer

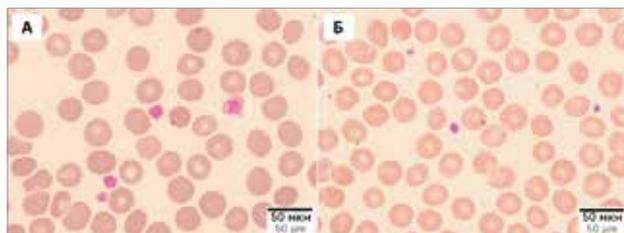


Таблица 2

Морфологические характеристики тромбоцитов нашей пациентки

Table 2

Morphological characteristics of platelets of the patient

Показатель Parameter	Норма Normal range	17 лет 17 y.o.	19 лет 19 y.o.
Средний диаметр, мкм Mean diameter, μm	1,69–2,63	3,47	2,97
Средняя площадь, мкм ² Mean area, μm^2	4,03–4,75	10,13	7,52
Минимальный диаметр, мкм Minimum diameter, μm		1,78	1,9
Максимальный диаметр, мкм Maximum diameter, μm		5,97	6,36
< 2,0 мкм, % < 2,0 μm , %	44,67	2,3	7,9
2,0–4,0 мкм, % 2,0–4,0 μm , %	53,54	72,41	80,3
4,0–5,0 мкм, % 4,0–5,0 μm , %	1,76	19,54	9,2
> 5,0 мкм, % > 5,0 μm , %	0,13	5,75	2,6
IPF, %	1,4–4,6	9,7	8,6

Note. IPF – immature platelet fraction.

Нормализация размера тромбоцитов с возрастом сопровождалась признаками ослабления их способности к контракции (рисунок 2Б), а повышенная и не изменяющаяся при активации гранулярность (рисунок 2Е) может объясняться персистирующей вакуолизацией тромбоцитов.

Таким образом, с возрастом количество тромбоцитов увеличивалось, а размер и гранулярность в покое закономерно уменьшались (рисунок 2, таблица 3), приближаясь к нормальным значениям, подтверждая данные микроскопии (таблица 2). Однако показатели активационных изменений по индексам FSC и SSC, напротив, демонстрировали признаки ослабления, подобно тому как это было описано для пациентов с мутациями *ANKRD26* [10], *RUNX1* и *ETV6* [16], что согласуется с данными о нарушении адгезии и распластывания тромбоцитов на фибриногеновой подложке при тромбоцитопениях *RUNX1* и *ETV6* [17, 18] и может быть объяснено нарушением механизмов перестройки цитоскелета тромбоцитов.

CD42b является рецептором фактора фон Виллебранда (ГП Ib/V/IX). Количество рецептора отражает способность тромбоцитов к первичной адгезии к коллагену I и III типов [19]. У пациентки в возрасте 17 лет уровень CD42b был повышен (рисунок 3А, Б), а его растворение/интернализация при активации были ослаблены по сравнению с КГ (рисунок 3В), подобно тому как это было описано у пациентов с *ANKRD26* и эссенциальной тромбоцитемией [10, 12]. В возрасте 18 лет все показатели CD42b не отличались от КГ, несмотря на увеличенный размер тромбоцитов (рисунок 3А, Б). В возрасте 19 лет уровень CD42b был повышен (рисунок 3А, Б), но индекс активации находился в пределах значений КГ (рисунок 3В). Таким образом, с возрастом у пациентки наблюдалась тенденция к нормализации показателей CD42b (рисунок 3, таблица 3) одновременно с уменьшением размера тромбоцитов.

CD61 (ГП IIIa) является субъединицей рецептора фибриногена (ГП IIb/IIIa) [20]. Значение мембранного CD61 в покое в возрасте 17 лет было выше максимальных значений КГ, в возрасте 18 и 19 лет данный показатель не отличался от КГ (рисунок 4А). Выход CD61 из внутриклеточного депо при активации и индекс экспонирования CD61 оставались в норме при сравнении с КГ в период наблюдения (рисунок 4Б, В). Таким образом, показатели CD61 с возрастом нормализовались (рисунок 4, таблица 3), что коррелирует с уменьшением размера тромбоцитов.

Связывание антитела PAC1 с активированной (кластеризованной) формой ГП IIb/IIIa тромбоцитов в покое было выше относительно верхней границы КГ на протяжении всего времени наблюдения (рисунок 5А), что могло быть связано с увеличенным размером тромбоцитов. Однако после активации данный показа-

тель был ниже значений КГ (рисунок 5Б), что объясняет нарушение агрегации тромбоцитов пациентки с АДФ, коллагеном, TRAP и арахидоновой кислотой, подробно описанное ранее [8]. Закономерно индекс активации ГП IIb/IIIa (по PAC1) также был значительно снижен относительно КГ (рисунок 5В). Таким образом, нормализации этого показателя с возрастом не наблюдалось (рисунок 5, таблица 3).

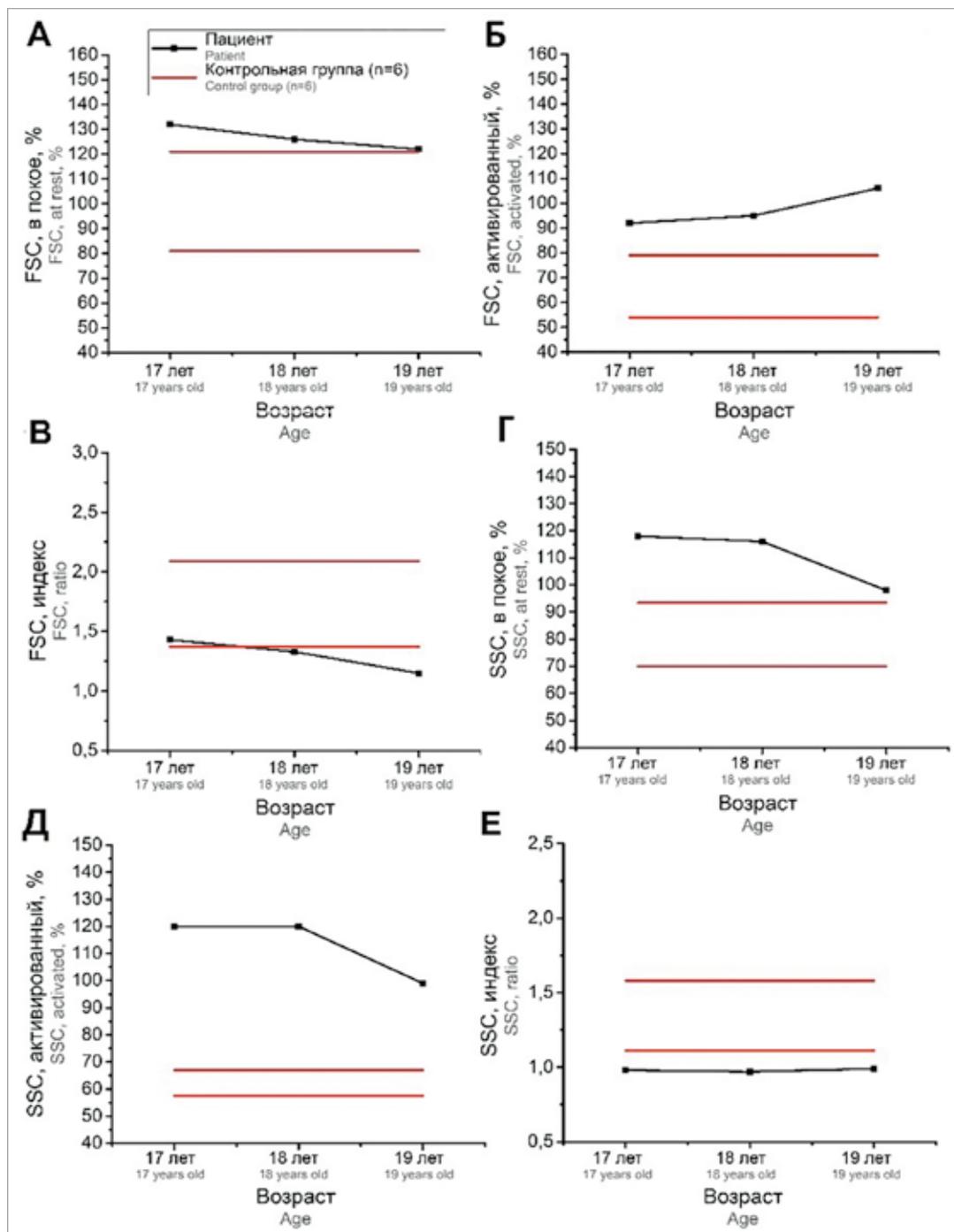
Доля FC^+ тромбоцитов в покое в течение всего времени наблюдения была повышена (рисунок 6А), что может указывать на усиленный апоптоз и ускоренный клиренс тромбоцитов, подобно тому как это было описано при синдроме Вискотта–Олдрича [21, 22] и иммунной тромбоцитопении [23, 24]. После активации доля FC^+ тромбоцитов находилась на нижней границе диапазона КГ (рисунок 6Б). Учитывая повышенную долю FC^+ тромбоцитов в покое, индекс образования прокоа-

Рисунок 2

Возрастная динамика изменения FSC (А – в покое; Б – после активации; В – индекс контракции) и SSC (Г – в покое; Д – после активации; Е – индекс дегрануляции)

Figure 2

Age-related changes in platelet size (FSC) (А – at rest; Б – after activation; В – ratio) and granularity (SSC) (Г – at rest; Д – after activation; Е – ratio)



гулянтных тромбоцитов был закономерно снижен и не имел возрастной динамики (рисунки 6В). Таким образом, выраженной тенденции к нормализации прокоагулянтной активности тромбоцитов по мере взросления пациентки не наблюдалось (рисунки 6, таблица 3).

В период наблюдения у пациентки не было выявлено признаков дефицита пула хранения и нарушения механизма высвобождения плотных и α -гранул. Так, флуоресценция загруженного мепакрина

плотных гранул была повышена как в покое, так и после активации на протяжении всего времени наблюдения относительно КГ, что коррелирует с увеличенным размером тромбоцитов пациентки. Индекс высвобождения плотных гранул не отличался от КГ за весь период наблюдения. CD62p мембраны тромбоцитов в покое и экстернализированный CD62p α -гранул после активации находились в пределах значений КГ, несмотря на увеличенный размер тром-

Таблица 3
Оценка функциональной активности тромбоцитов методом ПЦ

Table 3
Evaluation of platelet functional activity by flow cytometry

Параметр Parameter	КГ Control group	17 лет 17 y.o.	18 лет 18 y.o.	19 лет 19 y.o.
1	2	3	4	5
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{L}$	229 (219–376)	47	67	82
FSC:				
в покое, % at rest, %	107 (81–121)	132	126	122
после активации, % after activation, %	69 (54–79)	92	95	106
индекс (контракции) FSC в покое/после активации FSC ratio at rest/after activation	1,53 (1,37–2,09)	1,43	1,33	1,15
SSC:				
в покое, % at rest, %	84,6 (70–93,4)	118	116	98
после активации, % after activation, %	84,2 (57,5–66,9)	120	120	99
индекс (дегрануляции) SSC в покое/после активации SSC ratio at rest/after activation	1,19 (1,11–1,58)	0,98	0,97	0,99
ГП Ib (антиген CD42b): Glycoprotein (GP) Ib (CD42b antigen):				
в покое, % at rest, %	99 (68–118)	135	107	121
после активации, % after activation, %	57 (46–71)	98	69	82
индекс растворения CD42b в покое/после активации CD42b ratio at rest/after activation	1,71 (1,43–2,39)	1,38	1,55	1,47
ГП IIIa (антиген CD61): GP IIIa (CD61 antigen):				
в покое, % at rest, %	98 (91–113)	119	93	93
после активации, % after activation, %	261 (211–352)	340	284	286
индекс экспонирования CD61 после активации/в покое CD61 ratio after activation/at rest	2,58 (2,28–3,45)	2,86	3,05	3,08
1	2	3	4	5
Связывание PAC1 (активированный ГП IIb/IIIa): PAC-1 binding (activated GP IIb/IIIa):				
в покое, % at rest, %	3,31 (3,02–4,1)	4,8	10,8	5,2
после активации, % after activation, %	116 (76–165)	33	26	33
индекс активации ГП IIb/IIIa (по PAC1) после активации/в покое PAC-1 ratio after activation/at rest	36 (21–48)	6,87	2,41	6,35
Флуоресценция загруженного мепакрина в плотных гранулах: Fluorescence of mepacrine-loaded dense granules:				
в покое, % at rest, %	85 (73–118)	165	195	150
после активации, % after activation, %	22 (19–35)	62	64	53
индекс высвобождения плотных гранул dense granules release index at rest/after activation	4,1 (2,2–4,8)	2,7	3,1	2,8
Антиген CD62p: CD62p antigen:				
в покое, % at rest, %	2,35 (2,1–4)	2,8	2,3	2,5
после активации, % after activation, %	93 (78–114)	84	86	110
индекс высвобождения α -гранул (по CD62p) после активации/в покое release index of α -granules (by CD62p) after activation/at rest	41 (20–47,5)	30	37,39	44
Доля прокоагулянтных тромбоцитов (по аннексину V): The proportion of procoagulant platelets (by annexin V):				
в покое, % at rest, %	0,3 (0,05–0,7)	2,28	2,64	1,33
после активации, % after activation, %	19 (6,2–37,1)	10,80	6,50	8,03
индекс образования прокоагулянтных тромбоцитов после активации/в покое index of the formation of procoagulant platelets after activation/at rest	66 (21–332)	4,74	2,46	6

боцитов. Индекс выброса α -гранул после активации/в покое за все время наблюдения оставался в пределах значений КГ (таблица 3).

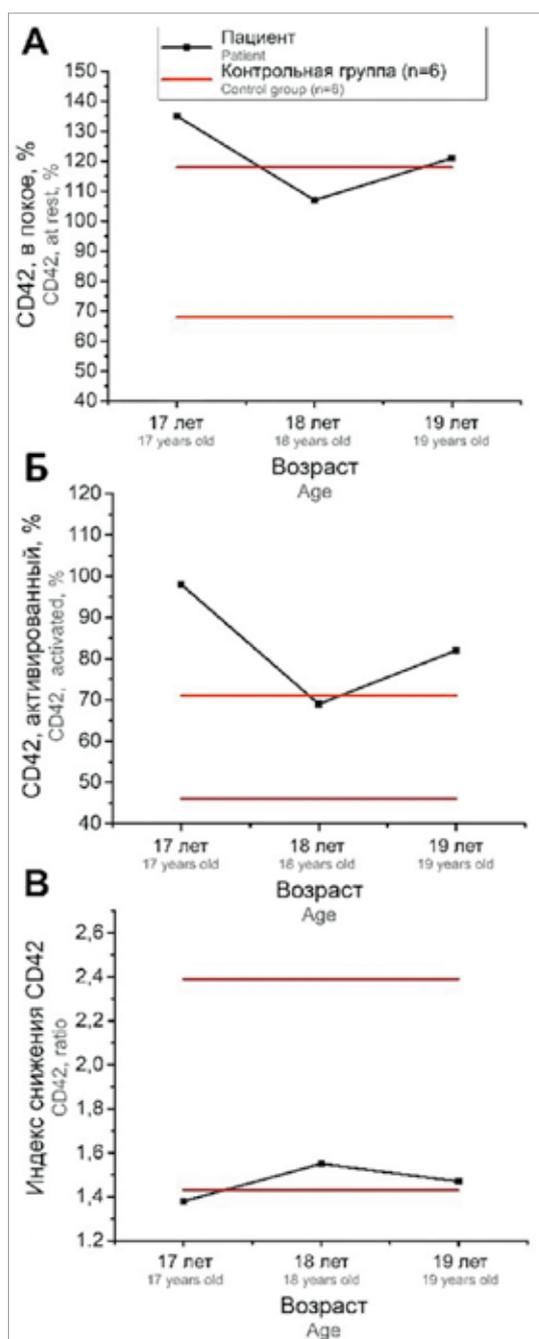
Таким образом, в период наблюдения были выявлены последовательное увеличение количества тромбоцитов, уменьшение их размера и гранулярности в покое, нормализация ГП Ib/V/IX (по CD42b) и ГП IIb/IIIa (по CD61) до значений КГ, оставались сохранными показатели пула хранения α - и плотных гранул,

Рисунок 3

Возрастная динамика изменения рецептора CD42b на мембране тромбоцитов
А – в покое; Б – после активации; В – индекс растворения

Figure 3

Age-related changes in the CD42b receptor on platelet membrane
A – at rest; B – after activation; B – ratio



без существенной положительной динамики были сниженные показатели активации ГП IIb/IIIa (по PAC1) и прокоагулянтной активности тромбоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

У пациентки по мере взросления уменьшалась тяжесть геморрагического синдрома и в ходе 3-летнего клиничко-лабораторного обследования

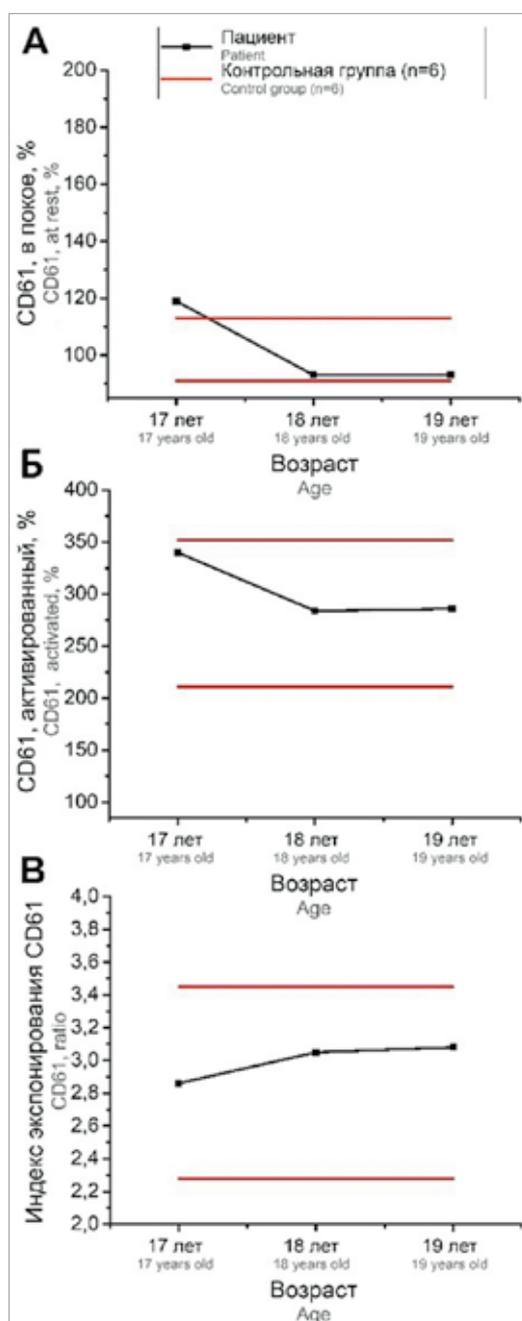
Рисунок 4

Возрастная динамика изменения плотности рецептора CD61 на мембране тромбоцитов

А – в покое; Б – после активации; В – индекс экспонирования

Figure 4

Age-related changes in the density of CD61 receptor on platelet membrane
A – at rest; B – after activation; B – ratio



наблюдалась тенденция к частичной нормализации характеристик тромбоцитов.

Считается, что увеличение доли IPF говорит об усиленной регенераторной функции костного мозга. Также известно, что экстернализованный на экзоплазматический листок мембраны ФС передает сигналы для апоптотического клеточного клиренса тромбоцитов (макрофагами, эндотелиальными клетками) и может быть важным маркером элими-

нации прокоагулянтных тромбоцитов [25, 26]. Таким образом, повышенные значения IPF и доли ФС⁺ тромбоцитов в покое у пациентки может быть связано с ускоренным клиренсом патологических тромбоцитов. Наблюдавшиеся с возрастом увеличение количества, уменьшение размера и гранулярности, снижение числа IPF и прокоагулянтных тромбоцитов могут указывать на ослабление интенсивности клиренса тромбоцитов пациентки. Однако все вышеперечис-

Рисунок 5

Возрастная динамика активации ГП IIb/IIIa
А – в покое; Б – после активации; В – индекс активации рецептора

Figure 5
Age-related changes in GP IIb/IIIa
A – at rest; Б – after activation; В – ratio

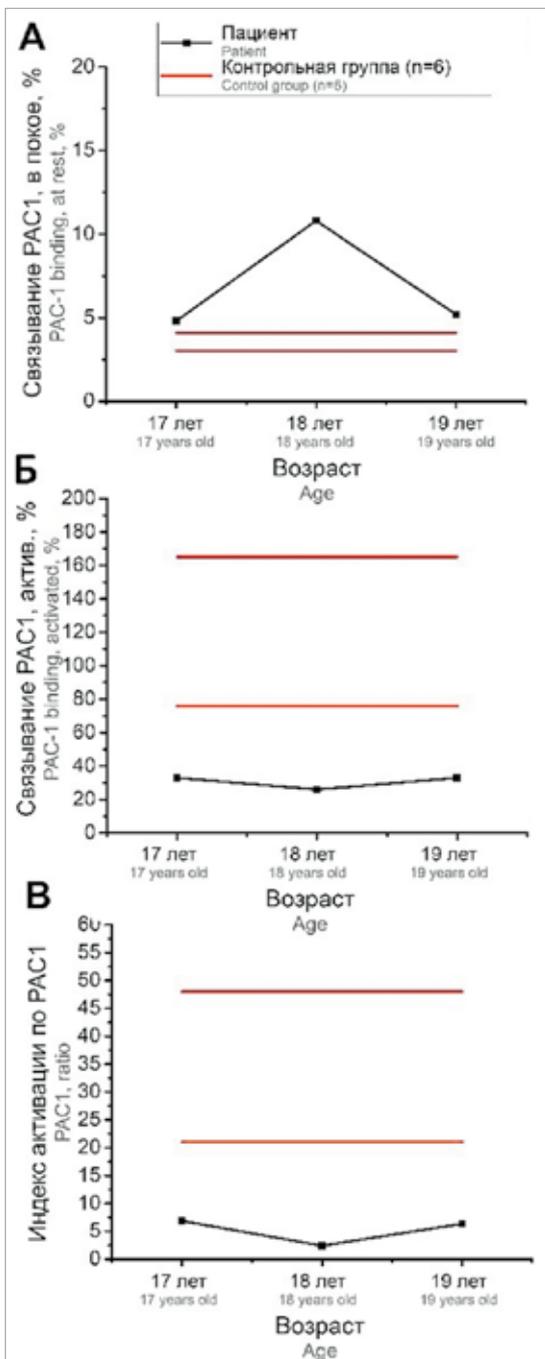
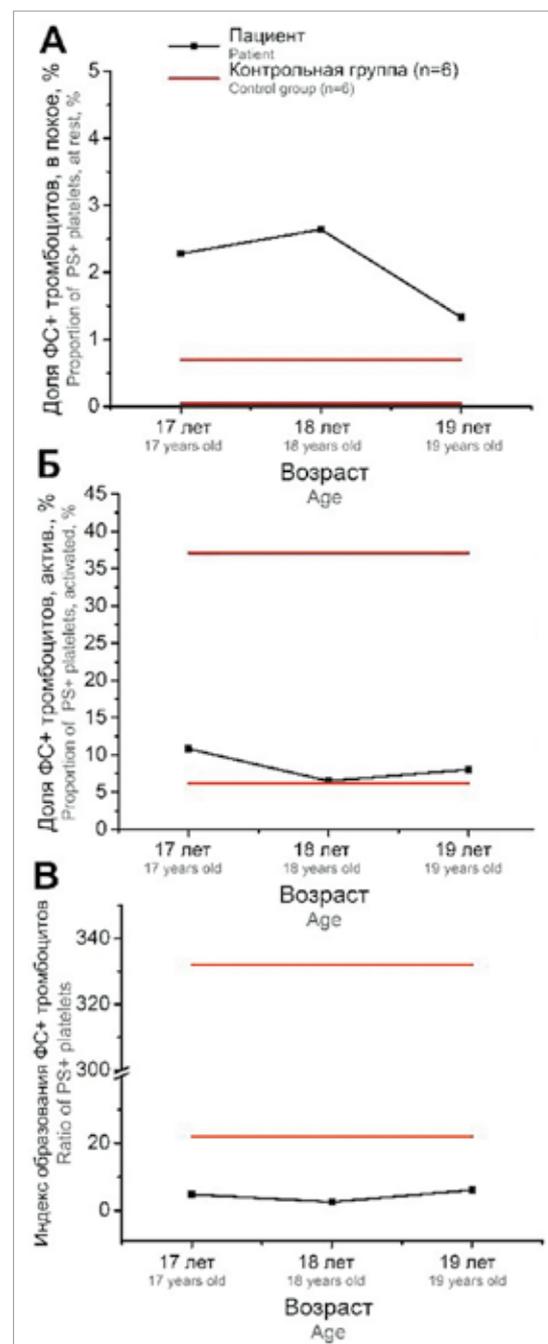


Рисунок 6

Возрастная динамика изменения доли прокоагулянтных тромбоцитов
А – в покое; Б – после активации; В – индекс образования

Figure 6
Age-related changes in the proportion of procoagulant platelets
A – at rest; Б – after activation; В – ratio



ленные показатели оставались вне нормальных значений весь период наблюдения.

Ранее сообщалось о 3 пациентах со схожей мутацией *SLFN14* (с.657 A>T, р.Lys219Asn) [3, 5], приводящей к нарушению структуры белка *SLFN14* в том же сайте, но отличающемся от нашей пациентки на 1 аминокислоту (с.655 A>G, р.Lys219Glu) [8]. Возможно, такое различие в структуре белка привело к дефициту плотных гранул у ранее описанных пациентов [3] и сохранности количества и функции плотных и α -гранул у нашей пациентки в течение всего периода наблюдения.

Считается, что при многих макротромбоцитопениях дифференцировка и созревание мегакариоцитов сохранены, а тромбоцитопения возникает из-за изменений в вытягивании и высвобождении протромбоцитов из зрелых мегакариоцитов и/или превращении протромбоцитов в тромбоциты в кровотоке [27]. Данные С. Marconi и соавт. по пациентам с *SLFN14* показали сочетание уменьшения количества мегакариоцитов в периферической крови с дефектом удлинения протромбоцитов [4]. Об аномалиях внутриклеточных органелл, возникающих вследствие нарушений мегакариоцитопоэза, ранее сообщалось для ряда тромбоцитопатий, например при синдроме белых тромбоцитов [28] и синдроме серых тромбоцитов [29]: тромбоциты были увеличены, в клетках обнаруживались комплексы Гольджи, вакуоли, избыточно развитые канальцевые сети, центриолы и другие признаки нарушения созревания. При *ANKRD26*-связанной тромбоцитопении сообщалось об уменьшении α -гранул, увеличении канальцевой сети [30] и общей гранулярности [10]. У нашей пациентки тромбоциты также были выражено вакуолизированы и характеризовались повышенной гранулярностью в течение всего периода наблюдения, что согласуется с литературными данными для НТ.

Взросление пациентки сопровождалось постепенной нормализацией размера тромбоцитов и законо-

мерным снижением ГП Ib/V/IX и ГП IIb/IIIa на мембране тромбоцитов. Однако сниженное связывание PAC-1 с кластеризованной формой ГП IIb/IIIa не изменялось в период наблюдения, указывая на устойчивое нарушение внутриклеточной мобилизации кальция при стимуляции TRAP и CRP, сочетавшееся с нарушениями агрегации в ответ на АДФ, коллаген, TRAP, адреналин и арахидоновую кислоту, описанными ранее [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдение за пациенткой с мутацией *SLFN14* показало отчетливые и последовательные изменения количественных и морфофункциональных характеристик тромбоцитов, коррелирующих с улучшением клинической картины по мере взросления. Вероятно, увеличение числа тромбоцитов, уменьшение доли FC⁺ тромбоцитов в покое и размера тромбоцитов обуславливало уменьшение геморрагических проявлений. Изучение возраст-зависимых особенностей течения НТ представляется нам перспективным подходом для углубленного понимания механизмов кровоточивости и создания новых подходов к ведению таких пациентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Rashevskaya E.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1650-1817>

Polokhov D.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6905-2878>

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

Ignatova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-3937>

Ponomarenko E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8697-7570>

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

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

Poletayev A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5209-2099>

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

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

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

- Bury L., Falcinelli E., Gresele P. Learning the Ropes of Platelet Count Regulation: Inherited Thrombocytopenias. *J Clin Med* 2021; 10 (3): 533.
- Oved J.H., Lambert M.P., Kowalska M.A., Poncz M., Karczewski K.J. Population based frequency of naturally occurring loss-of-function variants in genes associated with platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2021; 19 (1): 248–54.
- Fletcher S.J., Johnson B., Lowe G.C., Bem D., Drake S., Lordkipanidzé M., et al. *SLFN14* mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest* 2015; 125 (9): 3600–5.
- Marconi C., Di Buduo C.A., Barozzi S., Palombo F., Pardini S., Zaninetti C., et al. *SLFN14*-related thrombocytopenia: identification within a large series of patients with inherited thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2016; 115 (5): 1076–9.
- Saes J.L., Simons A., de Munnik S.A., Nijziel M.R., Blijlevens N.M.A., Jong-

- mans M.C., et al. Whole exome sequencing in the diagnostic workup of patients with a bleeding diathesis. *Haemophilia* 2019; 25 (1): 127–35.
6. Stapley R.J., Pisareva V.P., Pisarev A.V., Morgan N.V. *SLFN14* gene mutations associated with bleeding. *Platelets* 2020; 31 (3): 407–10.
 7. Stapley R.J., Smith C.W., Haining E.J., Bacon A., Lax S., Pisareva V.P., et al. Heterozygous mutation *SLFN14* K208N in mice mediates species-specific differences in platelet and erythroid lineage commitment. *Blood Adv* 2021; 5 (2): 377–90.
 8. Polokhov D., Fedorova D., Ignatova A., Ponomarenko E., Rashevskaya E., Martyanov A., et al. Novel *SLFN14* mutation associated with macrothrombocytopenia in a patient with severe haemorrhagic syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2023; 18 (1): 74. DOI: 10.1186/s13023-023-02675-9
 9. Mezzano D., Pereira J. Approach to the Patient with Platelet-Related Bleeding. In: *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Gresele P., et al. (eds.) Cham: Springer International Publishing; 2017. Pp. 717–25.
 10. Полохов Д.М., Федорова Д.В., Пшонкин А.В., Игнатова А.А., Пономаренко Е.А., Алексенко М.Ю. и др. Особенности фенотипа тромбоцитов у детей с *ANKRD26*-ассоциированной тромбоцитопенией. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2021; 20 (2): 65–73. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-65-73
 11. Полохов Д.М., Пшонкин А.В., Игнатова А.А., Пономаренко Е.А., Федорова Д.В., Алексенко М.Ю. и др. Особенности пула хранения и морфологии тромбоцитов у детей с неуточненным геморрагическим синдромом. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2021; 20 (1): 58–65. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-58-65
 12. Polokhov D.M., Ershov N.M., Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Gaskova M.V., Zharkov P.A., et al. Platelet function and blood coagulation system status in childhood essential thrombocythemia. *Platelets* 2020; 31 (8): 1001–11.
 13. Bidlingmaier C., Grote V., Budde U., Olivieri M., Kurnik K. Prospective evaluation of a pediatric bleeding questionnaire and the ISTH bleeding assessment tool in children and parents in routine clinical practice. *J Thromb Haemost* 2012; 10 (7): 1335–41.
 14. Reference intervals for immature platelet fraction and immature platelet count – Seo – 2015 – *International Journal of Laboratory Hematology – Wiley Online Library* [Electronic resource]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12237> (accessed 03.07.2022).
 15. Aslan J.E. Platelet Shape Change. In: *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Gresele P., et al. (eds.) Cham: Springer International Publishing; 2017. Pp. 321–36.
 16. Полохов Д.М. Диагностика нарушений функции тромбоцитов у детей с использованием метода проточной цитометрии. Дис. ... канд. мед. наук. М.; 2023. 157 с.
 17. Glembotsky A.C., Bluteau D., Espasandin Y.R., Goette N.P., Marta R.F., Marin Oyarzun C.P., et al. Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with familial platelet disorder with a predisposition to acute myelogenous leukemia: potential role for candidate *RUNX1* targets. *J Thromb Haemost* 2014; 12 (5): 761–72.
 18. Melazzini F., Palombo F., Balduini A., De Rocco D., Marconi C., Noris P., et al. Clinical and pathogenic features of *ETV6*-related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; 101 (11): 1333–42.
 19. Sadler J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 199; 67: 395–424.
 20. Calvete J.J. On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208 (4): 346–60.
 21. Shcherbina A., Rosen F.S., Remold-O'Donnell E. Pathological events in platelets of Wiskott–Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol* 1999; 106 (4) 875–83.
 22. 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* 2020; 105 (4): 1095–106.
 23. Catani L., Fagioli M.E., Tazzari P.L., Ricci F., Curti A., Rovito M., et al. Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. *Exp Hematol* 2006; 34 (7): 879–87.
 24. Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin – Winkler – 2012 – *British Journal of Haematology – Wiley Online Library* [Electronic resource]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2011.08973.x> (accessed 20.06.2022).
 25. Shin H.-W., Takatsu H. Phosphatidylserine exposure in living cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2020; 55 (2): 166–78.
 26. Ma R., Xie R., Yu C., Si Y., Wu X., Zhao L., et al. Phosphatidylserine-mediated platelet clearance by endothelium decreases platelet aggregates and procoagulant activity in sepsis. *Sci Rep* 2017; 7 (1): 4978.
 27. Thon J.N., Macleod H., Begonja A.J., Zhu J., Lee K.-C., Mogilner A., et al. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun* 2012; 3 (1): 852.
 28. White J.G., Key N.S., King R.A., Vercellotti G.M. The White platelet syndrome: A new autosomal dominant platelet disorder. *Platelets* 2004; 15 (3): 173–84.
 29. Nurden A.T., Nurden P. The gray platelet syndrome: Clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007; 21 (1): 21–36.
 30. Botero J.P., Chen D., He R., Viswanatha D.S., Majerus J.A., Coon L.M., et al. Clinical and laboratory characteristics in congenital *ANKRD26* mutation-associated thrombocytopenia: A detailed phenotypic study of a family. *Platelets* 2016; 27 (7): 712–5.

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 28.03.2023
Принята к печати 26.04.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-166-176

Антрациклин-индуцированная кардиотоксичность у ребенка с острым лимфобластным лейкозом на фоне новой коронавирусной инфекции

Г.В. Кондратьев¹, М.Е. Мельников¹, С.А. Кулева^{1,2}, А.С. Чепелев¹, С.Л. Баннова¹, Т.Л. Корнишина¹, И.А. Решетняк¹, К.Д. Мурашева¹

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Контактная информация:

Кондратьев Глеб Валентинович, врач-детский онколог, ассистент кафедры онкологии, детской онкологии и лучевой терапии ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России
Адрес: 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2
E-mail: spbgvk@mail.ru

Химиопрепараты антрациклинового ряда широко используются при лечении различных опухолей, однако они обладают высокой кардиотоксичностью. Новая коронавирусная инфекция также может негативно влиять на функцию сердца. В данной работе представлен клинический случай проявления антрациклин-ассоциированной кардиотоксичности у ребенка с рефрактерным течением острого лимфобластного лейкоза на фоне присоединения новой коронавирусной инфекции, в котором описана динамика изменения инструментальных и лабораторных показателей в течение лечения, а также приведено описание аутопсийного материала миокарда. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе микросфотографий, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, COVID-19, SARS-CoV-2, новая коронавирусная инфекция, кардиотоксичность, антрациклины, противоопухолевые антибиотики

Кондратьев Г.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 166–76. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-166-176

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 28.03.2023
Accepted 26.04.2023

Anthracycline-induced cardiotoxicity in a child with acute lymphoblastic leukaemia against the background of new coronavirus infection

G.V. Kondratiev¹, M.E. Melnikov¹, S.A. Kulyova^{1,2}, A.S. Chepelev¹, S.L. Bannova¹, T.L. Kornishina¹, I.A. Reshetnyak¹, K.D. Murasheva¹

¹Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

²N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

Anthracycline chemotherapy drugs are widely used for the treatment of various tumors but they are associated with high cardiotoxicity. The novel coronavirus disease can also negatively affect the heart function. In this article, we report a case of anthracycline-related cardiotoxicity in a child with refractory acute lymphoblastic leukemia and the novel coronavirus disease, describing changes in instrumental and laboratory parameters observed over time during the treatment and providing a description of autopsy samples of the myocardium. The patient's parents gave their consent to the use of their child's data, including photographs, for research purposes and in publications.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, COVID-19, SARS-CoV-2, novel coronavirus disease, cardiotoxicity, anthracyclines, antineoplastic antibiotics

Kondratiev G.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 166–76. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-166-176

Correspondence:
Gleb V. Kondratiev, a pediatric oncologist, an assistant lecturer at the Department of Oncology, Pediatric Oncology and Radiation Therapy at the St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 2 Litovskaya St., 194100, St. Petersburg, Russia
E-mail: spbgvk@mail.ru

Химиопрепараты антрациклинового ряда широко используются при лечении различных опухолей, однако они обладают высокой кардиотоксичностью. Лечение антрациклинами ассоциировано с повышенным риском развития сердечной недостаточности (СН) и/или систолической дисфункцией левого желудочка (ЛЖ). Стандартизированного определения антрациклиновой кардиотоксичности нет, а отсутствие четких критериев ее развития влияет на частоту и своевременность постановки

диагноза [1]. Новая коронавирусная инфекция (SARS-CoV-2, COVID-19) также может негативно влиять на функции сердца, в связи с этим изучение нежелательных реакций, индуцированных назначением антрациклинов на фоне данного заболевания или после него, необходимо для ранней диагностики и своевременного начала лечения сердечных осложнений, вызванных сочетанием этих факторов.

Нами был проведен ретроспективный анализ клинических характеристик, данных лабораторных

и инструментальных обследований ребенка 2 лет. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе микрофотографий, в научных исследованиях и публикациях. Комплекс обследования функции сердца включал выполнение эхокардиографии (ЭхоКГ) с измерением фракции выброса ЛЖ (ФВЛЖ) в зависимости от кумулятивной дозы антрациклинов, а также по окончании химиотерапии (ХТ). Дважды были определены уровни тропонина hS, креатинфосфокиназы-MB, мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) и выполнена электрокардиография (ЭКГ). Была изучена и проанализирована литература по теме антрациклиновой кардиотоксичности.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Мальчик Е., 2 года. Основной диагноз: острый лимфобластный лейкоз, иммунологический вариант TIV, CD1a⁻ TCR⁺ без значимых хромосомных аберраций, очень ранний изолированный костномозговой рецидив от 22.10.2020, 2-я активная фаза, рефрактерное течение. Прогрессирование. Состояние после длительной комбинированной сдерживающей паллиативной ХТ. Специфическое опухолевое поражение параорбитальной клетчатки и век обоих глаз. Нейролейкемия от 03.05.2021.

Конкурирующий диагноз: U07.1. Коронавирусная инфекция. SARS-CoV-2+ (вирус идентифицирован от 18.01.2021).

Осложнения: постцитостатическая аплазия кроветворения. Вторичная кардиомиопатия. Белково-энергетическая недостаточность.

В июле 2020 г. по совокупности клинико-лабораторных данных диагностирован острый лимфобластный лейкоз, пациент был зарегистрирован в центральном офисе исследования ALL-MB 2015, в соответствии с критериями стратификации отнесен к терапевтической группе T-HR.

В связи с наличием предшествующей лихорадки с момента поступления проводилась комбинированная противомикробная терапия (цефтриаксон, флуконазол, ко-тримоксазол), в дальнейшем она дважды корректировалась в связи с сохранением фебрильной лихорадки и нарастанием значений белков острой фазы (БОФ) в крови. На фоне проводимого лечения (меропенем, метронидазол, амикацин, амфотерицин В) достигнута апирексия. В связи со стабилизацией состояния была начата специфическая полихимиотерапия. Большую часть этапа индукции пациент находился в состоянии глубокой депрессии кроветворения, продолжал получать профилактическую противомикробную терапию, дополнительно назначались препараты рифаксимин, ципрофлоксацин, полимиксин. На фоне проводимой терапии развилась картина выраженной перифе-

рической полинейропатии (невозможность вертикализации, запоры), потребовавшей редукции дозы винкристина до 50%.

На 36-й день зафиксирована первая клинико-гематологическая ремиссия.

В дальнейшем на фоне проводимой терапии развились обширный некротический мукозит желудочно-кишечного тракта, умеренная энтеропатия, острый панкреатит, эпизод фебрильной лихорадки на фоне глубокой лейкоцитопении без повышения уровня БОФ. Пациент получал комбинированную противомикробную терапию (цефтазидим, меропенем, амикацин, метронидазол, ванкомицин) с хорошим эффектом.

На 23-й день от начала блока F2 на основании данных миелограммы диагностирован очень ранний изолированный костномозговой рецидив острого лимфобластного лейкоза. Пациент заочно обсужден с кооперативной группой MB 2015, принято решение о проведении противорецидивного курса химиотерапии препаратами резерва (флударабин-, неларабин-содержащие блоки полихимиотерапии).

При контрольной мультиспиральной компьютерной томографии органов грудной клетки 23.10.2020 выявлена двусторонняя полисегментарная пневмония, флуконазол был заменен на микафунгин с дальнейшей отрицательной динамикой в виде появления новых очагов (исследование от 02.11.2020), обнаружена *Pseudomonas aeruginosa*. Выполнена коррекция противомикробной терапии в соответствии с чувствительностью (ципрофлоксацин, тиенам, ванкомицин, амфотерицин В). После стабилизации состояния по жизненным показаниям начата полихимиотерапия. На фоне проведения блока полихимиотерапии отмечались лабораторные признаки синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Выполнена трансфузионная терапия с положительным эффектом. После восстановления гемопозза проведено контрольное обследование (миелограмма, иммунофенотипирование, люмбальная пункция), с учетом рефрактерности заболевания к проводимой терапии принято решение о выполнении блока полихимиотерапии с неларабином.

После начала инфузии ПЭГ-аспарагиназы развилась картина анафилактического шока со снижением сатурации до 80%, явления шока купированы. От продолжения введения ПЭГ-аспарагиназы решено воздержаться, принято решение о введении этопозида. Днем 30.12.2020 на фоне аплазии кроветворения, проводимой антимикробной терапии (ванкомицин, ко-тримоксазол, метронидазол, флуконазол) началась фебрильная лихорадка с последующим подъемом температуры тела до 41°C, с нормальным уровнем БОФ, SpO₂ = 99%. Усилена

противомикробная терапия – меропенем, амикацин, линезолид, микафунгин.

На основании данных контрольного обследования констатирована резистентность опухолевого процесса к терапии. С 12.01.2021 пациент признан инкурабельным, принято решение о проведении паллиативной и симптоматической терапии. На фоне лечения (цитарабин, этопозид, митоксантрон) была достигнута стабилизация опухолевого процесса в виде улучшения состояния и самочувствия ребенка, снижения частоты и высоты лихорадки, опухолевого лейкоцитоза, параклинической активности опухолевого процесса. В дальнейшем ребенок был выписан в связи с отказом матери от дальнейшего лечения в условиях первичной медицинской организации и получением альтернативной консультации трансплантационного центра, который выразил готовность провести трансплантацию костного мозга в данной ситуации и запланировал госпитализацию пациента.

В приемном отделении трансплантационного центра 18.01.2021 был идентифицирован SARS-CoV-2, в связи с чем ребенок перегоспитализирован в отделение для детей с COVID-19. При поступлении в специализированное детское инфекционное отделение у ребенка отмечались глубокая депрессия костномозгового кроветворения и тяжелый синдром госпитализма. За время госпитализации в отделении для детей с COVID-19 пациенту регулярно (1 раз в 3–4 дня) проводилось определение РНК коронавируса SARS-CoV-2 в мазке из носа и зева, отмечалось стойкое персистирование вируса. Учитывая наличие геморрагического и анемического синдромов, ребенку регулярно проводились гемотрансфузии облученными гемокомпонентами. Для коррекции иммунодефицитного состояния проводились повторные введения внутривенных иммуноглобулинов. Учитывая глубокую нейтропению, пациенту выполнялись комбинированная антибактериальная и противогрибковая терапия, весь спектр симптоматической и сопроводительной терапии. За время госпитализации не отмечены поражение легких и наличие дыхательной недостаточности, также не было зафиксировано признаков цитокинового шторма. Иммунологические исследования демонстрировали наличие IgG к SARS-CoV-2 на фоне выявления РНК коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) в мазке из носа и зева. Согласно рекомендациям Европейской ассоциации по трансплантации костного мозга (EBMT), пациенты перед проведением аллогенной трансплантации обязательно должны обследоваться на наличие COVID-19 (мазок из носоглотки на SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции). Начало режима кондиционирования костного мозга

возможно только при наличии отрицательного теста на SARS-CoV-2. Для сдерживания опухолевого процесса ребенку проводилась полихимиотерапия, в том числе с использованием антрациклиновых антибиотиков.

Пациент получил кумулятивную дозу антрациклиновых антибиотиков 162 мг/м².

С 29.07.2020 по 12.08.2020 – 1-й период терапии антрациклинами (даунорубицин, суммарно 40 мг), в дальнейшем ребенок получал идарубицин с 07.11.2020 по 11.11.2020 (15 мг) и 20.02.2021 (3 мг), а также митоксантрон с 11.01.2021 по 13.01.2021 (13 мг) и с 03.02.2021 по 12.02.2021 (10 мг).

Первая ЭхоКГ была выполнена 15.07.2020 до начала ХТ, ФВЛЖ составила 79%.

По результатам ЭхоКГ от 27.01.2021, которая была проведена на 182-й день от начала лечения антрациклинами, ФВЛЖ составила 69%. На 190-й день (04.02.2021) после даунорубицина в дозе 40 мг, идарубицина 15 мг, митоксантрона 18 мг – 67%. На 198-й день (12.02.2021) после митоксантрона в дозе 5 мг дополнительно – 65%. На 212-й день (26.02.2021) после идарубицина в дозе 3 мг дополнительно – 40%. На 227-й день от начала применения антрациклинов (13.03.2021; после проведения предыдущей ЭхоКГ антрациклины не применялись) – 33%.

Значительное снижение ФВЛЖ (на 12% от значений, полученных при первом измерении) было отмечено на 190-й день от начала терапии антрациклинами. На 212-й день после дозы 80 мг, когда ФВЛЖ составила 40%, было принято решение отказаться от введения препаратов данной группы, однако ФВЛЖ продолжала снижаться. Ребенок был консультирован кардиологом. Учитывая прогрессивное снижение глобальной сократительной способности ЛЖ на фоне постцитостатического кардиотоксического воздействия антрациклинов, рекомендованы курсы терапии фосфокреатином по 1 г внутривенно капельно №12, которые были проведены 02.03.2021–05.03.2021 и 16.03.2021–23.03.2021. Получен выраженный положительный эффект: на 236-й день (22.03.2021) ФВЛЖ составила 56%, на 260-й день (15.04.2021) – 69%, на 275-й день (30.04.2021) – 67% (рисунки 1).

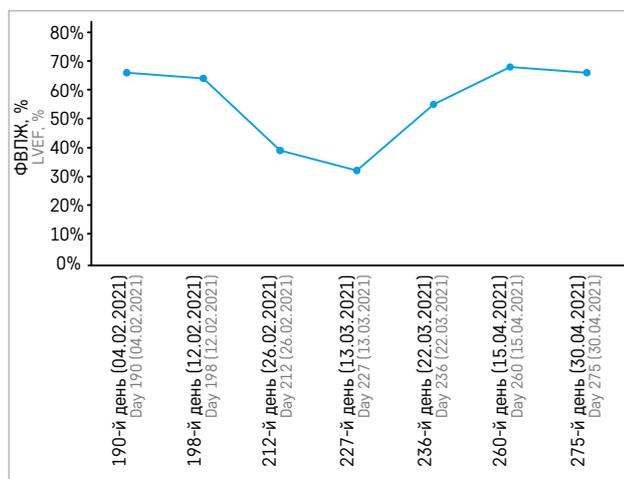
Уровень тропонина hS в крови от 03.03.2021 (после применения антрациклинов) составил 10,4 пг/мл, от 04.03.2021 – 11,4 пг/мл, что соответствовало референсным значениям (норма до 14 пг/мл).

Уровень креатинфосфокиназы-МВ в крови от 17.03.2021 составил 0,6 нг/мл, что также соответствовало норме (до 5,99 нг/мл).

Значение NT-proBNP в крови от 22.03.2021 составило 218 пг/мл (при норме < 125 пг/мл для возраста < 75 лет), что превышает норму практически в 2 раза.

Рисунок 1
Изменения ФВЛЖ с течением времени

Figure 1
Changes in the left ventricular ejection fraction (LVEF) over time



По данным ЭКГ изменений не наблюдалось. Эпизодов аритмии или гипотонии зафиксировано не было. На ЭКГ от 25.01.2021 QT = 0,28, от 18.03.2021 QT = 0,34 (норма).

С середины апреля 2021 г. отмечалось стремительное прогрессирование опухолевого процесса без ответа на сдерживающую химиотерапию с развитием признаков нейрорлейкемии; 04.05.2021 ребенок скончался.

Масса сердца при аутопсии – 61,0 г, размеры: 7,4 × 5,5 × 3,3 см. Сердце имеет вид несколько уплощенного конуса, расположено в среднем средостении. Сосуды расположены правильно. Сердце эластичной консистенции. Клапаны сердца сформированы правильно. Эпикард и перикард синюшно-розового цвета, эндокард розоватого цвета с участками синюшного цвета, миокард эластичный серо-красного цвета. В полостях сердца определяется небольшое количество жидкой темной крови. Состояние нижней полой вены без особенностей, обычного анатомического и гистологического строения.

При гистологическом исследовании сердца обращал на себя внимание выраженный отек эпикарда, также отмечалось большое количество полнокровных сосудов разного калибра, в сосудах микроциркуляторного русла определялось формирование смешанных тромбов. Миокард с умеренно выраженным полнокровием, отечный. Кардиомиоциты с определяемой поперечной исчерченностью, умеренно выраженными дистрофическими изменениями, такими как крупная и мелкая вакуолизация цитоплазмы, в части ядер отмечалось неравномерное распределение хроматина. Наряду с этим в миокарде определялась мелкоочаговая лимфоцитарная инфильтрация, преимущественно пери-

васкулярно. Эндокард с признаками отека. Легкие конусовидной формы с ровной поверхностью, эластичной консистенции с неравномерным кровенаполнением. Плевральные листки легких тусклые, тонкие. Правое легкое имеет 3 доли. Левое легкое состоит из 2 долей, консистенция эластичная. Ткань легких с очаговыми ателектазами, чередующимися с эмфизематозными участками, с наличием мелко- и крупноочаговых кровоизлияний преимущественно в расширенные за счет склероза межальвеолярные перегородки. Большая часть альвеол звездчатой формы, очагово заполнены эритроцитами, слущенными альвеолоцитами, альвеолярными макрофагами. Часть альвеол заполнена белковыми массами с выстилкой внутренней поверхности гиалиновыми мембранами. Слизистая терминальных бронхиол и бронхов большего калибра представлена цилиндрическим эпителием с дистрофическими изменениями, местами слущенными, в сохраненных участках с явлениями пролиферации. В просвете бронхиол и более крупных бронхов десквамированный эпителий, единичные эритроциты, макрофаги, в части бронхов определялись эозинофильные массы слоистого вида. Кроме этого, преимущественно перибронхиально отмечена диффузная лимфоцитарная инфильтрация с примесью умеренного количества нейтрофильных лейкоцитов. Наряду с этим отмечено полнокровие сосудов разного калибра с выраженным склерозом стенок артерий и артериол. В части сосудов микроциркуляторного русла – смешанные тромбы. Архитектоника печени сохранена. Большая часть гепатоцитов набухшие, с мелкими вакуолями и мелкой зернистостью в цитоплазме, с признаками внутриклеточного холестаза. Ядра большинства гепатоцитов округлой формы с хорошо различимыми ядрышками. Желчные протоки мелкие, правильной формы. Отмечено очаговое полнокровие мелких и более крупных сосудов. Перипортально определялась очаговая инфильтрация лимфоцитами. Также зафиксированы мелко- и крупноочаговые кровоизлияния, преимущественно субкапсулярно. Портальная вена без особенностей, обычного гистологического строения. Признаки бактериальной инфекции отмечались только в дыхательной системе, грибкового поражения в органах не наблюдалось.

При морфологическом исследовании аутопсийного материала миокард характеризовался умеренно выраженным полнокровием, был отечный. Кардиомиоциты формировали пучки клеток, разделенных утолщенными за счет склероза соединительнотканскими прослойками, в них определялись немногочисленные паретически расширенные полнокровные кровеносные сосуды микроциркуляторного русла, часть из которых с утолщенной склерозированной стенкой и наличием в просвете формирующихся эритро-

цитарных тромбов. Периваскулярно отмечались межучасточный отек, плазматическое пропитывание. Часть кардиомиоцитов были со стертой поперечной исчерченностью, выраженными дистрофическими изменениями, такими как крупная и мелкая вакуолизация цитоплазмы, с очаговыми явлениями миоцитолита. Диффузно отмечалось разволокнение мышечных пучков ввиду выраженного отека. Наряду с этим в миокарде определялась преимущественно периваскулярная мелкоочаговая лимфоцитарная инфильтрация. Эндокард также характеризовался дистрофическими изменениями в виде набухания коллагеновых волокон и субэндотелиального отека (рисунки 2–8).

При проведении иммуногистохимического исследования аутопсийного материала из парафинового блока с антителами к CD95 выявлена положительная экспрессия в цитоплазме кардиомиоцитов и эндотелии сосудов микроциркуляторного русла и эндокарда (рисунок 9).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антрациклин-индуцированная кардиотоксичность обычно классифицируется на следующие варианты:

- острая (или ранняя), при которой возникают обратимые эффекты во время лечения;
- подострая – побочные эффекты обнаруживаются в течение года после лечения, встречается наиболее часто и обычно представляет собой дилатационную или гипокинетическую кардиомиопатию, ведущую к СН;
- хроническая – негативные последствия выявляют спустя годы.

Однако эта классификация условна и базируется в основном на ретроспективных исследованиях, сообщающих о развитии СН у пациентов, пролеченных антрациклинами. Скорее всего, мы наблюдаем различные стадии одного процесса [1, 2].

К ранним признакам относятся нарушения, которые видны на ЭКГ (тахикардия покоя, изменения ST-T, нарушения проводимости, удлинение интервала QT и аритмии (желудочковые и наджелудочковые), атриовентрикулярная блокада), и синдром перикардита-миокардита (особенно при применении митоксантрона). У некоторых пациентов ранние признаки желудочковой дисфункции развиваются с признаками СН или без них. Более высокие риски ранней кардиотоксичности отмечены у пациентов старше 50 лет. Нет доказанных способов определения, является ли кардиальная дисфункция обратимой или будет прогрессировать, однако повышение кардиальных биомаркеров за период проведения ХТ – возможный путь к идентификации угрожающей отсроченной кардиотоксичности [3]. В исследе-

Рисунок 2
Миокард. Периваскулярный отек и диапетезные кровоизлияния. Нарушение архитектоники миокарда (хаотично расположенные пучки поперечнополосатых миоцитов). Окраска гематоксилином и эозином, × 40

Figure 2
The myocardium. Perivascular edema and diapedetic bleeding. Abnormal myocardial architecture (chaotically arranged bundles of striated myocytes). Hematoxylin & eosin staining, × 40

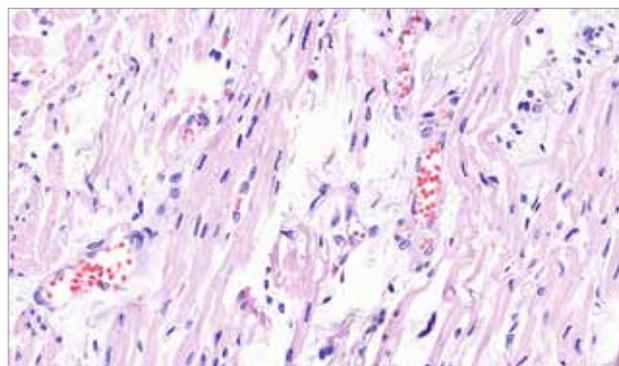


Рисунок 3
Эндокард. Выраженные дистрофические изменения эндотелия (набухание, субэндотелиальный отек). Окраска гематоксилином и эозином, × 40

Figure 3
The endocardium. Severe dystrophic changes in the endothelium (swelling, subendothelial edema). Hematoxylin & eosin staining, × 40

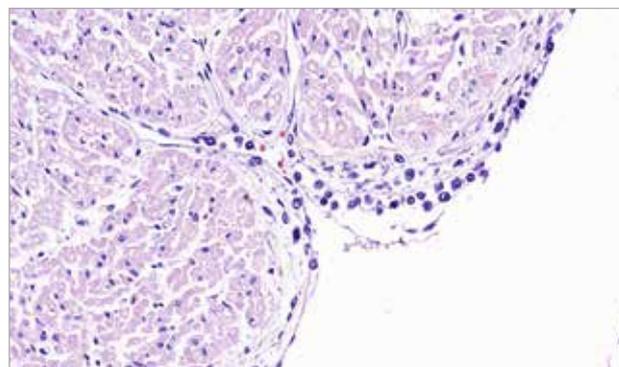


Рисунок 4
Миокард. Дистрофические изменения кардиомиоцитов (истончение клеток, выраженный перичеселлярный отек, нарушение архитектоники). Окраска гематоксилином и эозином, × 40

Figure 4
The myocardium. Dystrophic changes in cardiomyocytes (cell thinning, severe pericellular edema, abnormal architecture). Hematoxylin & eosin staining, × 40

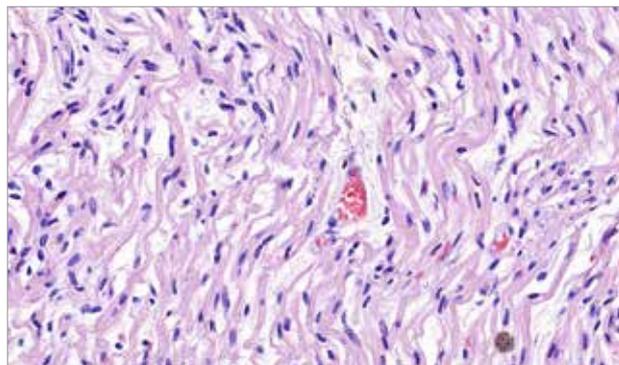
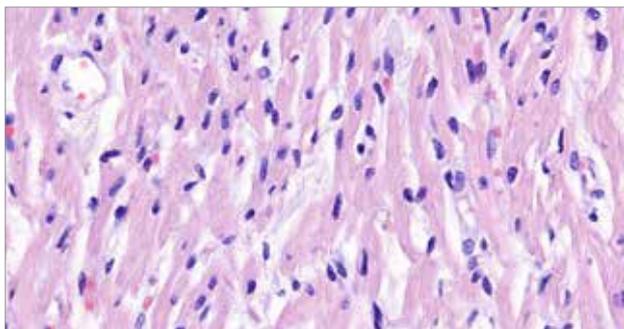


Рисунок 5

Миокард. Очаговая сглаженность поперечной исчерченности. Окраска гематоксилином и эозином, × 40

Figure 5

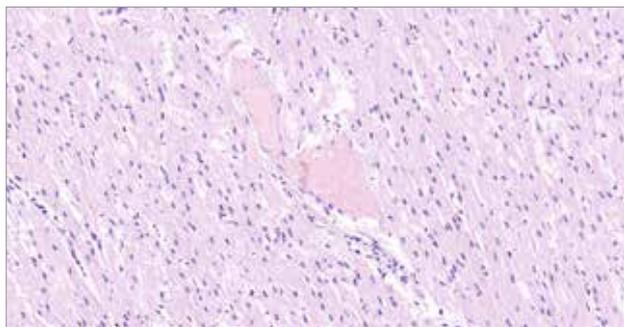
The myocardium. Focal loss of cross-striation. Hematoxylin & eosin staining, × 40

**Рисунок 6**

Миокард. Образование эритроцитарного тромба в сосуде микроциркуляторного русла. Окраска гематоксилином и эозином, × 20

Figure 6

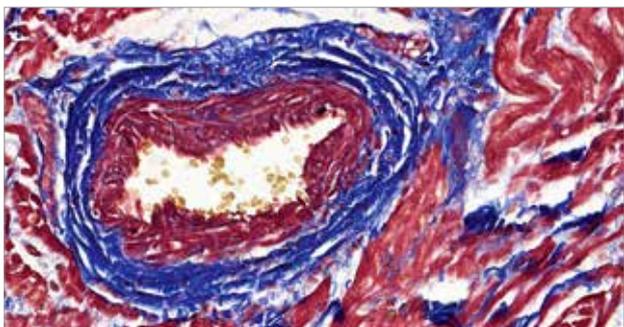
The myocardium. The formation of a red blood cell thrombus in a vessel of the microcirculation. Hematoxylin & eosin staining, × 20

**Рисунок 7**

Миокард. Выраженный периваскулярный склероз. Окраска трихромом по Массону, × 40

Figure 7

The myocardium. Severe perivascular sclerosis. Masson's trichrome staining, × 40



довании D. Cardinale и соавт. (2015), включающем 2625 пациентов с различными злокачественными новообразованиями (ЗНО), было показано, что антрациклин-индуцированная кардиотоксичность возникла в 9% случаев, наиболее часто в течение первого года после окончания ХТ, а также была дозозависимой [2].

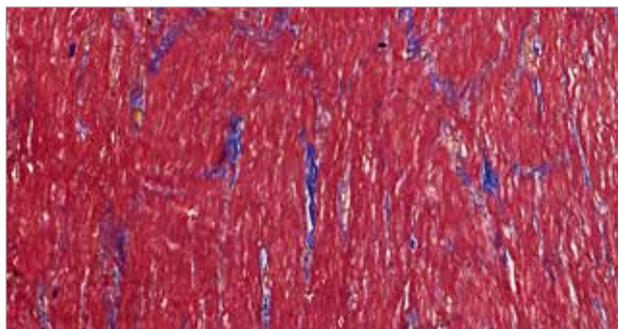
Поздняя манифестация антрациклиновой кардиотоксичности включает симптомы и признаки СН

Рисунок 8

Миокард. Диффузный кардиосклероз. Окраска трихромом по Массону, × 40

Figure 8

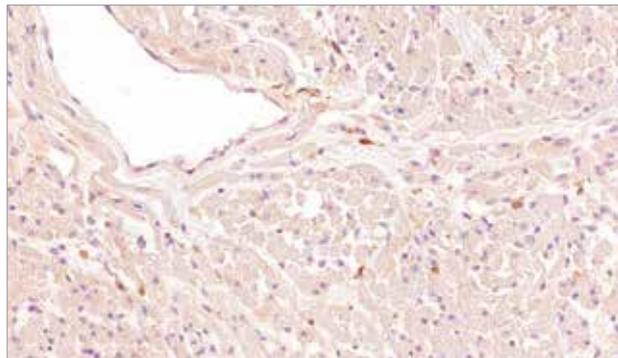
The myocardium. Diffuse cardiosclerosis. Masson's trichrome staining, × 40

**Рисунок 9**

Миокард. Диффузная экспрессия CD95 в кардиомиоцитах и эндотелии сосудов. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD95, × 40

Figure 9

The myocardium. Diffuse CD95 expression in cardiomyocytes and in the endothelium of vessels. Immunohistochemistry with antibodies to CD95, × 40



(одышка, усталость, отеки и ортопноэ). Снижение ФВЛЖ может возникнуть как на фоне СН, так и без нее. У пациентов отмечаются повышение тропонинов и снижение ФВЛЖ (абсолютное значение < 50% или < 10% от исходных значений). ФВЛЖ является наиболее распространенным показателем для определения кардиотоксичности, однако пороговые значения ее снижения широко варьируют. Имеются данные, указывающие на то, что значительное повреждение сердца/кардиотоксичность может возникать и без снижения ФВЛЖ [1, 4]. Кроме того, ФВЛЖ может снижаться во время лечения, но после его окончания возвращаться к нормальным значениям [4]. В целом возникновение поздней симптоматической антрациклин-индуцированной кардиотоксичности широко варьирует и зависит от возраста, дозы антрациклинов, наличия гематологической опухоли, сердечно-сосудистых факторов риска, анамнеза сердечно-сосудистых заболеваний, включая сниженную ФВЛЖ перед началом ХТ.

В исследовании D. Cardinale и соавт. (2004) у пациентов с различными ЗНО с ранним (сразу после

окончания высокодозной ХТ) и поздним (спустя месяц после ХТ) подъемом тропонина I была выявлена взаимосвязь с дальнейшим снижением ФВЛЖ, а большинство случаев повышения тропонина I было обнаружено в группах пациентов, которые лечились по схемам, состоящим из доцетаксела, эпирубина и циклофосфамида или эпирубина и циклофосфамида. Однако следует учитывать, что в данном исследовании наблюдение за пациентами проводилось лишь в течение 1 года после окончания ХТ, поэтому дальнейшие исходы (например, у пациентов с нормальным уровнем тропонина I) неизвестны [5].

Кардиотоксичность через десятки лет после ХТ была описана в основном у взрослых, перенесших онкологические заболевания в детстве. Период между окончанием лечения и выявлением кардиомиопатии мог достигать 30 лет [6].

В исследовании К.С. Oeffinger и соавт. (2006), включавшем 10 397 человек, выживших после детского рака, часть которых проходила лечение антрациклинами, был выявлен достаточно высокий риск развития хронических патологий, в их число входили сердечно-сосудистые заболевания. Кроме того, их число увеличивалось с течением времени [6].

Кардиотоксичность, возникающая в результате проведения ХТ, бывает двух типов – 1-го и 2-го, деление это основано на действии препарата на кардиомиоциты. Кардиотоксичность 1-го типа необратима, обусловлена гибелью кардиомиоцитов в результате некроза или апоптоза, она дозозависимая и имеет высокую вероятность прогрессирования, может привести к трудноизлечимой СН или смерти. Кардиотоксичность 2-го типа обусловлена дисфункцией кардиомиоцитов, поэтому является обратимой и не зависит от количества введенного препарата. Долгосрочная кардиотоксичность, вызванная действием антрациклинов, относится к 1-му типу [7, 8].

Достаточно распространена бессимптомная дисфункция ЛЖ, и она встречается гораздо чаще, чем симптоматическая. Если ориентироваться на признаки СН, то поставить диагноз можно только через несколько лет, и кардиотоксичность будет расценена как поздняя. Однако при регулярном определении ФВЛЖ и выявлении ее снижения диагноз будет поставлен раньше, а кардиотоксичность отнесена к острой [2].

Среди больных, подвергающихся терапии с включением антрациклинов, необходимо выявление пациентов группы высокого риска по развитию СН и антрациклин-индуцированной кардиотоксичности.

Согласно руководству Американского общества клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology, ASCO) по профилактике и мониторингу сердечной недостаточности у взрослых, перенесших онкологические заболевания в детстве, используются

следующие критерии для определения группы пациентов с риском развития нарушений работы сердца при использовании антрациклинов:

1) высокодозная ХТ антрациклинами (например, кумулятивные дозы доксорубина ≥ 250 мг/м², эпирубина ≥ 600 мг/м²);

2) высокодозная (≥ 30 Гр) лучевая терапия (ЛТ) с включением в поле облучения сердца;

3) более низкие дозы антрациклинов (например, кумулятивные дозы доксорубина < 250 мг/м², эпирубина < 600 мг/м²) в сочетании с более низкими дозами ЛТ (< 30 Гр) с включением в поле облучения сердца;

4) лечение антрациклинами в более низких дозах (например, кумулятивные дозы доксорубина < 250 мг/м², эпирубина < 600 мг/м²) или только анти-HER2-препаратом (трастузумабом) и наличие любого из следующих факторов риска:

- множественные сердечно-сосудистые факторы риска (≥ 2), включая курение, гипертензию, диабет, дислипидемию и ожирение, которые присутствуют во время терапии или возникли после ее окончания;

- возраст ≥ 60 лет;

- нарушения функции сердца (например, погранично низкая ФВЛЖ (50–55%), инфаркт миокарда в анамнезе, умеренная или большая клапанная болезнь сердца) до или во время лечения;

5) лечение более низкими дозами антрациклинов (например, кумулятивные дозы доксорубина < 250 мг/м², эпирубина < 600 мг/м²) с последующим переходом на трастузумаб (последовательная терапия) [1, 4, 9].

Повторные назначения антрациклинов приводят к дозозависимому повреждению кардиомиоцитов и интерстициальным изменениям, ассоциированным с ранней диастолической или поздней систолической сердечной дисфункцией [10].

При наличии генетического полиморфизма в генах, кодирующих НАДФН-оксидазу, и генов *MRP1*, *MRP2* существует повышенный риск развития кардиомиопатии даже при получении относительно небольших доз антрациклинов. Такие пациенты могут быть чувствительны к антрациклиновой терапии независимо от получаемых доз [7, 11].

Также к факторам риска относятся:

- болюсное введение препарата. В исследовании J. Sharira и соавт. (1990) проводилось сравнение ФВЛЖ двух групп пациентов: первой вводили доксорубин в течение 15–20 мин, второй – в течение 6 ч. В результате было обнаружено, что после кумулятивной дозы доксорубина 400 мг/м² у первой группы ФВЛЖ в среднем снижалась на 21%, а у второй – всего на 6% [12];

- женский пол [6];

- возраст < 4 лет;

- комбинация с другими кардиотоксичными противоопухолевыми препаратами (трастузумаб, циклофосфамид, паклитаксел и др.);

- хроническая болезнь почек [13].

Кумулятивная доза антрациклинов является постоянным фактором риска.

Учет этих факторов, а также использование ХТ без антрациклинов (когда это возможно) заметно снижают частоту развития антрациклин-индуцированной СН. Поэтому решение о назначении лечения антрациклинами должно основываться на потенциальной пользе для больного и исключать потенциальные риски сердечных осложнений. Для этого необходимо принятие общего решения онколога и кардиолога. Пациентам, у которых нет факторов риска по развитию антрациклин-индуцированной кардиотоксичности, а также тем, у кого лечение антрациклинами показывает хорошие результаты, решение об их назначении не вызывает сомнений в отличие от больных с сочетанием нескольких факторов риска [7].

Применение бета-блокаторов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, а также антагонистов альдостерона и статинов может сохранить систолическую функцию ЛЖ у пациентов из группы риска [11]. В исследовании N. Kalay и соавт. (2006) профилактическое назначение альфа-, бета-адреноблокатора карведилола 12,5 мг ежедневно 1 раз в день во время антрациклиновой ХТ оказывало защитное действие на систолическую и диастолическую функции ЛЖ, а ФВЛЖ в этой группе в среднем была близка к начальным значениям. Однако оценка функции сердца производилась только перед началом ХТ, а также через 6 мес после ее окончания, поэтому эффективность карведилола спустя более длительное время неизвестна [14].

Поскольку нет конкретных указаний на то, как часто проводить обследование функции сердца при назначении антрациклиновой ХТ и что оно должно включать, мониторинг носит рекомендательный характер. Показатели работы сердца оценивают перед началом лечения, в течение всей терапии, а также после ее завершения.

Согласно рекомендациям Российского общества клинической онкологии (RUSSCO) до начала противоопухолевой терапии необходимо выполнить:

- сбор жалоб в целях выявления симптомов, типичных для СН (одышка, утомляемость, плохая переносимость нагрузок, отеки нижних конечностей, ортопноэ, сердечная астма), анамнеза (сведения о наличии ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, других сердечно-сосудистых заболеваниях и их факторов риска, семейный анамнез);

- физикальное обследование с измерением офисного артериального давления;

- ЭхоКГ для оценки ФВЛЖ, глобальной продольной деформации миокарда ЛЖ (global longitudinal strain, GLS) (при доступности метода) и других показателей структурно-функционального состояния сердца;

- магнитно-резонансную томографию (МРТ) сердца, равновесную изотопную вентрикулографию – по показаниям (при недостаточной информативности ЭхоКГ);

- ЭКГ в 12 отведениях с расчетом QTc;

- биохимический анализ крови с определением липидного спектра, глюкозы, креатинина с расчетом клиренса креатинина и/или скорости клубочковой фильтрации, калия, натрия, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, креатинкиназы;

- сердечные биомаркеры: тропонин I или T (предпочтительно высокочувствительный), NT-proBNP – особенно у больных с высоким риском развития дисфункции ЛЖ/СН [13].

Опрос и физикальное обследование больных рекомендованы перед каждым циклом ХТ в целях выявления симптомов, типичных для СН. Для мониторинга функции сердца целесообразно использовать тот же метод, который применялся при первичной оценке ФВЛЖ.

ЭхоКГ рекомендуется в самом начале лечения для определения ФВЛЖ, при этом 3D-ЭхоКГ предпочтительна, если она доступна. В ином случае проводится 2D-ЭхоКГ с введением при необходимости контрастного вещества.

В случае неинформативности ЭхоКГ рекомендуется проведение МРТ с определением ФВЛЖ. Преимуществом метода является большая воспроизводимость, он позволяет избежать лучевой нагрузки. МРТ служит «золотым стандартом» измерения объема ЛЖ и ФВЛЖ, а также имеет возможность оценить другие параметры сердца.

Если ЭхоКГ и МРТ недоступны, для оценки ФВЛЖ применяют радионуклидную вентрикулографию (при наличии данного метода). Однако ограничения ядерной визуализации для оценки ФВЛЖ включают повторяющееся лучевое воздействие.

Эндомиокардиальная биопсия является «золотым стандартом» определения повреждения сердца после ХТ, однако этот метод инвазивный, поэтому он крайне редко используется в целях диагностики антрациклин-индуцированной кардиотоксичности.

Некоторые авторы считают, что достаточно лишь измерения ФВЛЖ для оценки кардиотоксичности при лечении антрациклинами, другие также оценивают глобальную деформацию ЛЖ в продольном направлении (GLS), но только в лабораториях, которые регулярно занимаются ее измерением и могут гарантировать надежные результаты. С помощью GLS

можно провести измерение деформации миокарда и достаточно рано определить субклиническую кардиотоксичность при относительном снижении GLS > 15% от исходного уровня [1]. По рекомендациям RUSSCO значимым является уменьшение показателя более чем на 12% от исходной величины. При измерении GLS в конце лечения антрациклинами удавалось прогнозировать дальнейшее снижение ФВЛЖ [4].

Определение уровня тропонинов у пациентов, получающих антрациклиновую ХТ, является спорным моментом. Некоторые исследования подтверждают прогностическую ценность повышенного уровня сердечного тропонина для последующей систолической дисфункции ЛЖ [5]. Ряд небольших исследований продемонстрировал взаимосвязь между повышением уровня тропонинов и снижением ФВЛЖ, которая в дальнейшем могла вернуться к исходным значениям. Однако иногда ФВЛЖ оставалась в пределах нормы, но были выявлены изменения других параметров на ЭхоКГ [15–17]. В рекомендациях RUSSCO отмечена необходимость определения данных маркеров [13]. В исследовании J.C. Plana и соавт. (2014) было доказано, что тропонин I является чувствительным и специфичным маркером повреждения миокарда у лиц, получавших антрациклиновую терапию, поэтому превышение его пороговых значений помогало выявлять пациентов группы высокого риска по дальнейшему развитию дисфункции сердца, возникающей в результате противоопухолевой терапии [8].

Последующая оценка включает сбор жалоб и обследование сердца, которые следует выполнять перед каждым циклом ХТ.

Пациентам, у которых развиваются симптомы и признаки СН, необходимо проводить повторную ЭхоКГ.

Оптимальная частота назначения ЭхоКГ бессимптомным пациентам, получающим антрациклиновую ХТ, не определена.

Согласно рекомендациям ASCO 2017 г., ЭхоКГ может выполняться в течение лечения, а также через 6 и 12 мес после окончания противоопухолевой терапии у пациентов без симптомов СН, относящихся к группе высокого риска по дисфункции сердца [9].

По рекомендациям RUSSCO больным с нормальной сократимостью сердца после лечения кардиотоксичными препаратами показано обследование в целях исключения дисфункции ЛЖ спустя 6–12 мес, в последующем – 1 раз в 2 года.

В исследовании H. Sawaya и соавт. (2012), в котором принимали участие женщины, больные раком молочной железы и лечившиеся антрациклинами с последующим переходом на таксаны и трастузумаб, еще раз была доказана важность определения ультра-

чувствительного тропонина I, но только в комбинации с определением глобальной продольной деформации при проведении ЭхоКГ в конце лечения антрациклинами в целях выявления ранних признаков кардиотоксичности и своевременного начала терапии [4].

Безусловно, важным является наблюдение за выжившими взрослыми после перенесенного в детстве ЗНО, особое внимание следует обратить на вероятность развития сердечно-сосудистых заболеваний и поздней антрациклин-индуцированной кардиомиопатии [6].

Критерии дисфункции сердца, возникшие в результате лечения противоопухолевыми препаратами, следующие:

- снижение ФВЛЖ > 10 единиц от исходной величины или при абсолютном значении < 50%;
- снижение GLS более чем на 12% от начальной величины [13] или при относительном снижении > 15% от исходного уровня [1];
- уровень тропонинов I и T, превышающий верхнюю границу референсных значений.

Частота обследования бессимптомных пациентов с исходно нормальной функцией сердца при проведении ХТ препаратами антрациклинового ряда (на примере доксорубина) представлена в таблице.

Обследование пациентов с проявлениями СН решается индивидуально.

Особое место занимают больные с сочетанием лейкоза и COVID-19, у которых инфекция может способствовать неблагоприятному прогнозу. Длительная терапия больных острым лимфобластным лейкозом может привести к развитию нежелательных реакций и способствовать формированию вторичного

Таблица

Частота обследования бессимптомных пациентов с исходно нормальной функцией сердца при проведении ХТ препаратами антрациклинового ряда (на примере доксорубина)

Table

The frequency of testing in asymptomatic patients with normal baseline heart function during anthracycline chemotherapy (CT) (using the example of doxorubicin)

Кумулятивная доза доксорубина, мг/м ² Cumulative dose of doxorubicin, mg/m ²	Частота обследования Frequency of testing
≤ 240	Оценка функции сердца (ФВЛЖ, GLS) перед лечением, по окончании терапии и через 6 мес после нее A cardiac function test (LVEF, GLS) prior to treatment, at the end of treatment and 6 months afterwards
> 240	Оценка при данном значении, в дальнейшем – при увеличении дозы на каждые 50 мг/м ² [1] Testing should be done at 240 mg/m ² , and then after each additional 50 mg/m ² [1]
≤ 250	Определение ФВЛЖ, GLS, тропонина I или T – по завершении антрациклин-содержащей ХТ LVEF, GLS, troponin I or troponin T measurement at the end of anthracycline CT
> 250	Дополнительное обследование после каждого повышения дозы примерно на 100 мг/м ² [13] Additional testing after each dose increase by approximately 100 mg/m ² [13]

иммунодефицита. Помимо этого, антрациклиновые антибиотики, применяемые в протоколах лечения острого лимфобластного лейкоза, могут усугублять состояние пациента.

Дистрофическое воздействие на кардиомиоциты может также оказывать и инфицирование бета-коронавирусом SARS-CoV-2, что в настоящее время является актуальной темой для исследований, особенно у детей.

Возможные механизмы, вовлеченные в сердечную дисфункцию при COVID-19, включают в себя:

- прямое повреждение миокарда SARS-CoV-2 путем проникновения вируса в кардиомиоциты через рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2-го типа и его последующей репликации, что приводит к локальному воспалению, при котором наблюдается повышение уровня воспалительных факторов, таких как интерлейкин-1 β , интерферон- γ , CXCL10 (хемокиновый лиганд 10 с C-X-C мотивом), CCL2 (хемокиновый лиганд 2 с C-C мотивом), и активация лимфоцитов с последующим некрозом кардиомиоцитов [19–21];
- гипоксию, ассоциированную с пневмонией, что приводит к активации анаэробного метаболизма, вызывает метаболический ацидоз и индуцирует выработку свободных радикалов, тем самым разрушая липидный бислой клеточных мембран кардиомиоцитов. Кроме того, гипоксические условия могут способствовать усилению попадания ионов кальция в кардиомиоциты, что, в свою очередь, может стимулировать апоптоз [20, 21];
- применение механической искусственной вентиляции легких у детей в критическом состоянии, что приводит к падению сердечного выброса из-за снижения венозного возврата в правое сердце, дисфункции правого желудочка и нарушению растяжимости ЛЖ сердца [20, 21].

Роль определения тропонина в крови у педиатрических пациентов с COVID-19 гораздо менее определена, чем у взрослых, однако существуют данные, которые сообщают о его повышении и использовании в качестве маркера повреждения миокарда при инфицировании SARS-CoV-2 у детей [20, 21].

Диффузная экспрессия CD95 (Fas-рецептор), определяемая при иммуногистохимическом исследовании биоптата миокарда, свидетельствует об апоптозе кардиомиоцитов, так как активация данного рецептора приводит к образованию инициирующего смерть сигнального комплекса (death-inducing signaling complex) и последующей активации каспазы 8 и других эффекторных каспаз с реализацией программы клеточной смерти [22].

Таким образом, у представленного ребенка кардиотоксическое действие антрациклинов на миокард, сочетанное с течением COVID-19, иллюстрирует снижение ФВЛЖ по результатам ЭхоКГ,

а также высокий уровень NT-proBNP, который превышает пороговый показатель практически в 2 раза.

Как говорилось ранее, определение уровня тропонинов у пациентов, получающих антрациклиновую ХТ, является спорным моментом. RUSSCO рекомендует проводить тропониновый тест каждые 3–6 нед или перед каждым циклом ХТ в условиях одной и той же лаборатории [13].

BNP и NT-proBNP играют важную роль в развитии СН, однако их значение и прогностическая ценность в диагностике кардиотоксических осложнений ХТ до сих пор не изучены. У пациентов, у которых в дальнейшем развилась кардиотоксичность, эти показатели могли оставаться в пределах нормы по окончании терапии [4]. В исследовании I. Germanakis и соавт. (2006) была показана взаимосвязь повышенных значений NT-proBNP с последующим снижением массы миокарда ЛЖ у бессимптомных детей, которым проводилась ХТ антрациклинами, а это, в свою очередь, может быть предиктором развития субклинической кардиотоксичности [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При применении антрациклиновых антибиотиков может возникать кардиотоксичность (острая, отсроченная, поздняя). Ее проявлениями являются кардиомиопатия и нарушения ритма сердца.

Описанное в данной статье стремительное развитие кардиомиопатии может быть результатом сочетанного влияния антрациклиновых препаратов на миокард и COVID-19. Таким образом, при использовании антрациклинов у онкологических больных с COVID-19 или после него может существенно повышаться риск развития кардиотоксичности, что требует еще более тщательного контроля за функцией сердца. Для ее контроля необходимо выполнение ЭхоКГ (с оценкой ФВЛЖ), измерение тропонинов, а также NT-proBNP, контроль уровня электролитов в крови, учет кумулятивной дозы антрациклинов и факторов риска.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Kondratiev G.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1462-6907>

Melnikov M.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4744-0882>

Kulyova S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0390-8498>

Chepelev A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4127-3457>

Bannova S.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1351-1910>

Kornishina T.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6238-4121>

Reshetnyak I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5047-1749>

Murasheva K.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2674-1440>

Литература

- Asnani A., Neilan T.G., Tripathy D., Scherrer-Crosbie M. Clinical manifestations, monitoring, and diagnosis of anthracycline-induced cardiotoxicity. 2019. [Электронный ресурс] URL: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-monitoring-and-diagnosis-of-anthracycline-induced-cardiotoxicity>. (Accessed: 07.11.2022).
- Cardinale D., Colombo A., Bacchi-ani G., Tedeschi I., Meroni C.A., Veglia F., et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 2015; 131 (22): 1981–8. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777
- Обрезан А.Г., Щербак Н.В. Лечение онкологических заболеваний и кардиотоксичность: механизмы возникновения и современные подходы к диагностике сердечной недостаточности у онкологических пациентов. *Вопросы онкологии* 2019; 65 (2): 172–80.
- Sawaya H., Sebag I.A., Plana J.C., Januzzi J.L., Ky B., Tan T.C., et al. Assessment of echocardiography and biomarkers for the extended prediction of cardiotoxicity in patients treated with anthracyclines, taxanes, and trastuzumab. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012; 5 (5): 596–603. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.112.973321
- Cardinale D., Sandri M.T., Colombo A., Colombo N., Boeri M., Lamantia G., et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004; 109 (22): 2749–54. DOI: 10.1161/01.CIR.0000130926.51766.CC
- Oeffinger K.C., Mertens A.C., Sklar C.A., Kawashima T., Hudson M.M., Meadows A.T., et al. Chronic Health Conditions in Adult Survivors of Childhood Cancer. *N Engl J Med* 2006; 355 (15): 1572–82. DOI: 10.1056/nejmsa060185
- Volkova M., Russell R., 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev* 2011; 7 (4): 214–20. DOI: 10.2174/157340311799960645
- Plana J.C., Galderisi M., Barac A., Ewer M.S., Ky B., Scherrer-Crosbie Michael S., et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2014; 27 (9): 911–39. DOI: 10.1016/j.echo.2014.07.012
- Armenian S.H., Lacchetti C., Barac A., Carver J., Constine L.S., Denduluri N., et al. Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2017; 35 (8): 893–911. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.5400
- Monsuez J.J., Charniot J.C., Vignat N., Artigou J.Y. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol* 2010; 144 (1): 3–15. DOI: 10.1016/j.ijcard.2010.03.003
- Perez I.E., Taveras Alam S., Hernandez, G.A., Sancassani R. Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction: An Overview for the Clinician. *Clin Med Insights Cardiol* 2019; 13: 1179546819866445. DOI: 10.1177/1179546819866445
- Shapira J., Gotfried M., Lishner M., Ravid M. Reduced Cardiotoxicity of Doxorubicin by a 6-Hour Infusion Regimen. A Prospective Randomized Evaluation. *Cancer* 1990; 65: 870–3.
- Виценя М.В., Агеев Ф.Т., Гиляров М.Ю., Овчинников А.Г., Орлова Р.В., Полтавская М.Г. Практические рекомендации по коррекции кардиоваскулярной токсичности противоопухолевой лекарственной терапии. Практические рекомендации RUSSCO 2020; 10 (3s2): 81–102.
- Kalay N., Basar E., Ozdogru I., Er O., Cetinkaya Y., Dogan A., et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48 (11): 2258–62. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.07.052
- Auner H.W., Tinchon C., Linkesch W., Tiran A., Quehenberger F., Link H., Sill H. Prolonged monitoring of troponin T for the detection of anthracycline cardiotoxicity in adults with hematological malignancies. *Ann Hematol* 2003; 82 (4): 218–22. DOI: 10.1007/s00277-003-0615-3
- Specchia G., Buquicchio C., Pansini N., Di Serio F., Liso V., Pastore D., et al. Monitoring of cardiac function on the basis of serum troponin I levels in patients with acute leukemia treated with anthracyclines. *J Lab Clin Med* 2005; 145 (4): 212–20. DOI: 10.1016/j.lab.2005.02.003
- Kilickap S., Barista I., Akgul E., Aytemir K., Aksoyok S., Aksoy S., et al. cTnT can be a useful marker for early detection of anthracycline cardiotoxicity. *Ann Oncol* 2005; 16 (5): 798–804. DOI: 10.1093/annonc/mdi152
- Иванов Д.О., Петренко Ю.В., Резник В.А., Тимченко В.Н., Павлова Е.Б., Чернова Т.М. и др. COVID-19 на фоне острого лимфобластного лейкоза (анализ случая с летальным исходом). *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии* 2022; 14 (2): 73–82. DOI: 10.22328/2077-9828-2022-14-2-73-82
- Иванов Д.О., Кондратьев Г.В., Мельников М.Е., Баннова С.Л., Кулева С.А., Петренко Ю.В. и др. Клинический случай длительного персистирующего SARS-CoV-2 у младенца с врожденным острым миелоидным лейкозом. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2022; 9 (3): 99–106. DOI: 10.21682/2311-1267-2022-9-3-99-106
- Sanna G., Serrau G., Bassareo P.P., Neroni P., Fanos V., Marcialis M.A. Children's heart and COVID-19: Up-to-date evidence in the form of a systematic review. *Eur J Pediatr* 2020; 179 (7): 1079–87. DOI: 10.1007/s00431-020-03699-0
- Dolhnikoff M., Ferreira Ferranti J., de Almeida Monteiro R.A., Duarte-Neto A.N., Gomes-Gouvêa M.S., Degaspere N.V., et al. SARS-CoV-2 in cardiac tissue of a child with COVID-19-related multisystem inflammatory syndrome. *Lancet Child Adolesc Health* 2020; 4 (10): 790–4. DOI: 10.1016/S2352-4642(20)30257-1
- Penna A., Khadra N., Tauzin S., Vacher P., Legembre P. The CD95 signaling pathway: To not die and fly. *Commun Integr Biol* 2012; 5 (2): 190–2. DOI: 10.4161/cib.18888
- Germanakis I., Kalmanti M., Parthenakis F., Nikitovic D., Stiakaki E., Patrianakos A., Vardas P.E., et al. Correlation of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels with left ventricle mass in children treated with anthracyclines. *International journal of cardiology* 2006; 108 (2): 212–5. DOI: 10.1016/j.ijcard.2005.05.006

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-177-184

Использование технологий секвенирования следующего поколения в диагностике врожденных ошибок иммунной системы

Е.А. Полякова, И.Е. Гурьянова, В.Р. Вертелко, А.В. Любушкин, Е.Я. Скопонец, С.Н. Алешкевич, Ю.С. Жаранкова, С.О. Шарапова, М.В. Белевцев

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

Первичные иммунодефициты – врожденные генетически опосредованные нарушения иммунитета. Достижения в области молекулярно-генетических технологий позволяют проводить одновременное исследование большого количества генов у одного и того же пациента. Цель – провести оценку структуры мутационного профиля в образцах ДНК пациентов с различными вариантами первичных иммунодефицитов. В данном исследовании авторами продемонстрировано использование технологии секвенирования следующего поколения с применением панели, разработанной в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь), состоящей из 290 генов, в литературе ассоциированных с первичными иммунодефицитами. Исследование выполнено у 96 пациентов с клиническим анамнезом, указывающим на первичный иммунологический дефект. В результате выполненного исследования в 37,5% случаев (36/96 пациентов) выявлены дефекты в генах, приводящие к нарушениям иммунной системы.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, секвенирование, генные дефекты, панель генов, секвенирование следующего поколения

Полякова Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 177–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-177-184

The use of next generation sequencing technologies for the diagnosis of inborn errors of immunity

E.A. Polyakova, I.E. Guryanova, V.R. Vertelko, A.V. Liubushkin, K.Ya. Skapavets, S.N. Aleshkevich, Yu.S. Zharankova, S.O. Sharapova, M.V. Belevtsev

The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

Primary immunodeficiencies are congenital genetically determined immune disorders. Recent advances in molecular genetic technologies have enabled a simultaneous analysis of a large number of genes in a patient. The purpose of this study was to analyze the mutational spectrum in DNA samples collected from patients with various types of primary immunodeficiencies. In this study, we applied next-generation sequencing technology using a panel developed at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology and consisting of 290 genes that are associated with primary immunodeficiencies according to the existing literature. The testing was carried out in 96 patients with a clinical history suggesting a primary immunological defect. As a result, 37.5% of cases (36/96 patients) were found to harbor genetic defects that lead to disorders of the immune system.

Key words: primary immunodeficiency, sequencing, gene defects, gene panel, next generation sequencing

Polyakova E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 177–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-177-184

Первичные иммунодефициты (ПИД) – это генетические заболевания, которые влияют на развитие и/или функцию иммунной системы, тем самым повышая восприимчивость к инфекционным патогенам, аутовоспалению и злокачественным новообразованиям [1].

В настоящее время, по данным экспертного комитета Международного союза иммунологических обществ (IUIS), насчитывается более 485 генетических дефектов, затрагивающих различные компоненты иммунной системы [2]. Если ранее ПИД

считались моногенными заболеваниями, то благодаря молекулярно-генетическим достижениям последних лет установлено, что ПИД могут возникать и из-за полигенных дефектов [3]. Вариации генотипа и фенотипа ПИД с нетипичными проявлениями делают диагностику еще более сложной по причине того, что генетические дефекты в одном и том же гене могут приводить к различным клиническим проявлениям [4, 5]. Клинико-лабораторные признаки часто недостаточно специфичны, что не всегда позволяет с уверенностью поставить диагноз. Выявление молеку-

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 06.10.2022
Принята к печати 28.06.2023

Контактная информация:

Полякова Екатерина Александровна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь)
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: polyakovakat86@gmail.com

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 06.10.2022
Accepted 28.06.2023

Correspondence:

Ekaterina A. Polyakova, Cand. Biol. Sci., Head of the Laboratory of Genetic Biotechnology at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology
Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk District, Belarus
E-mail: polyakovakat86@gmail.com

лярно-генетической причины ПИД является важным для назначения своевременного таргетного индивидуального лечения либо куративного лечения – излечения пациента путем трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Секвенирование по Сэнгеру является традиционным подходом к исследованию генов, ассоциированных с ПИД, однако оно в основном направлено на секвенирование ДНК одного или очень небольшого числа генов, что требует много времени и часто приводит к запоздалой диагностике. Ввиду клинической и генетической гетерогенности ПИД применение данного метода в диагностике не всегда эффективно [5]. Достижения в технологиях секвенирования ДНК облегчили идентификацию мультигенных причин ПИД и выявили широкую фенотипическую изменчивость данных заболеваний [6].

Появление технологии секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS) явилось прорывом в области молекулярной биологии. Возможность генерирования огромного массива данных изменила научный подход к фундаментальным, прикладным и клиническим исследованиям [7, 8].

Технология NGS стала ценным диагностическим инструментом для своевременного определения генетических нарушений, в частности при сложных клинических проявлениях ПИД. Она позволила исследовать десятки, сотни и даже миллионы фрагментов генов одновременно путем их параллельного прочтения [8]. Использование NGS при диагностике ПИД может верифицировать заболевание на молекулярно-генетическом уровне у пациента с подозреваемым или классическим фенотипом, а также выявить новые генетические причины дефектов иммунной системы, расширить фенотипы генных заболеваний, прояснить механизм заболевания, тип наследования или выявить новые типы ПИД.

Полезность и эффективность применения технологии NGS в диагностике ПИД продемонстрирована в ряде исследований [9–13]. Ранняя диагностика ПИД имеет решающее значение для назначения своевременного лечения и улучшения качества жизни пациентов.

Цель исследования – провести оценку структуры мутационного профиля в образцах ДНК пациентов с различными вариантами ПИД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 96 пациентов, прошедших обследование на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) с клиническими и/или лабораторными признаками

нарушений иммунной системы. У 3/96 пациентов, включенных в исследование, был четкий клинический и иммунологический фенотип, соответствующий атаксии-телеангиэктазии. В 93/96 случаях четко очерченного фенотипа конкретного иммунодефицита не было по причине того, что ПИД – обширная группа наследственных заболеваний, которая включает множество нозологий, и предположить диагноз каждого пациента не всегда представлялось возможным.

В исследование не были включены пациенты с синдромом Диджорджи, поскольку диагностика данного типа ПИД проводится методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), а также пациенты с подозрением на синдром Ниймеген, у которых поиск «славянской мутации» гена *NBN* осуществляли методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру.

Для исследования использовали геномную ДНК пациентов, выделенную из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Минимальная пороговая концентрация выделенной ДНК составляла ≥ 10 нг/мкл с соотношением оптической плотности 260 нм/280 нм и 230 нм/260 нм $\geq 1,8$.

Для осуществления таргетного секвенирования сотрудниками ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) был сформирован генетический профиль, состоящий из 290 генов, мутации в которых могут приводить к первичной иммунной недостаточности, к ним относятся: *ACP5, ACTB, ADA, ADAR, AGA, AICDA, AIRE, AK2, ALG13, AP3B1, APOL1, ATM, B2M, BCL10, BLM, BLNK, BLOC1S6, BTK, CA2, CARD11, CARD14, CARD9, CASP10, CASP8, CCBE1, CD19, CD247, CD27, CD3D, CD3E, CD3G, CD4, CD40, CD40LG, CD79A, CD79B, CD8A, CEBPE, CECR1, CFHR1, CFHR3, CHD7, CIITA, CLCN7, CNBP, COLEC11, COPA, c, CREBBP, CSF2RA, CSF3R, CTLA4, CTPS1, CTSC, CXCR4, CYBA, CYBB, DCLRE1B, DCLRE1C, DKC1, DNMT3B, DOCK2, DOCK8, ELF4, EPG5, FADD, FAS, FASLG, FCGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCGR3B, FCGR3C, FERMT3, FOXP1, FOXP3, G6PC, G6PC3, G6PD, GATA1, GATA2, GF11, GJC2, GTF2H5, HAX1, ICOS, IFIH1, IFNGR1, IFNGR2, IGLL1, IKBKB, IKBKG, IKZF1, IL10, IL10RA, IL10RB, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL17F, IL17RA, IL17RC, IL18, IL1RN, IL21, IL21R, IL2RA, IL2RG, IL36RN, IL7R, INSR, IRAK4, IRF7, IRF8, ISG15, ITCH, ITGB2, ITK, JAGN1, JAK2, JAK3, KRAS, LAMTOR2, LCK, LIG1, LIG4, LPIN2, LRBA, LRRRC8A, LYST, MAGT1, MAL, MALT1, MAN2B1, MANBA, MAP3K14, MBD5, MBL2, MC2R, MCM4, MEFV, MKL1, MLPH, MOGS, MPO, MS4A1, MSH6, MTHFD1, MVK, MYD88, MYO5A, NBN, NCF1, NCF2, NCF4, NCSTN, NDNL2, NFAT5, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NHEJ1, NHP2, NKX2-5, NLRC4, NLRP12, NLRP3, NOD2, NOP10, NRAS,*

ORAI1, OSTM1, PARN, PCCA, PCCB, PEPD, PIGA, PIK3CD, PIK3R1, PLAG2, PMM2, PMS2, PNP, POLE, PRF1, PRKDC, PRPS1, PSENE1, PSMB8, PSTPIP1, PTPN11, PTPRC, PTRF, RAB27A, RAC2, RAG1, RAG2, RASGRP2, RBCK1, RECQL4, RFX5, RFXANK, RFXAP, RHOH, RMRP, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RNF168, RNF31, RORC, RPSA, RTEL1, SAMD9L, SAMHD1, SBDS, SEMA3E, SERAC1, SH2D1A, SH3BP2, SKIV2L, SLC11A1, SLC29A3, SLC35C1, SLC37A4, SLC39A4, SLC46A1, SMARCA1, SP110, SPINK5, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5B, STIM1, STK4, STX11, STXBP2, TAP1, TAP2, TAPBP, TAZ, TBK1, TBX1, TCF3, TCIRG1, TCN2, TERC, TERT, THBD, TICAM1, TIN2, TIRAP, TLR3, TMC6, TMC8, TMEM173, TNFRSF11A, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF1A, TNFRSF4, TNFRSF6B, TNFSF12, TNFSF4, TRAF3, TRAF3IP2, TREX1, TRNT1, TTC37, TTC7A, TYK2, UNC119, UNC13D, UNC93B1, UNG, USB1, VIPAS39, VPS13B, VPS33B, VPS45, WAS, WIPF1, WRAP53, XIAP. Дизайн олигонуклеотидных зондов осуществляли с помощью DesignStudio Custom Assay Design Tool (Illumina, США) [14]. Олигонуклеотидные зонды подбирали таким образом, чтобы обеспечить возможность детектирования всех экзонов, сплайс-сайт-регионов, регуляторных и UTR-областей интересующих генов (UCSC hg19). В результате были определены 4923 таргетных региона общей протяженностью 1 247 195 пар оснований с 99% покрытием. На основании разработанного дизайна пробы олигонуклеотидных зондов синтезировали в компании Illumina (США).

Образцы ДНК пациентов секвенировали путем парно-концевого прочтения с использованием реагентов для пробоподготовки библиотеки DNA Prep with Enrichment Reference Guide (Illumina, США) и проб зондов, обеспечивающих амплификацию целевых регионов, согласно протоколу производителя [15, 16]. Секвенирование осуществляли при помощи прибора для NGS – MiSeq (Illumina, США).

Предобработку данных NGS (оценка качества, тримминг и фильтрация) проводили с использованием программных решений FastQC и Trimmomatic. Референсную последовательность (сборка генома UCSC hg19) и все необходимые для анализа файлы брали с платформы/ресурса UCSC Genome Browser.

Процедуру выравнивания библиотеки на подготовленную референсную последовательность проводили с использованием программы BWA (версия 0.7.17). Последующую обработку результатов (фильтрация, дедупликация, рекалибровка) проводили в программах Samtools (версия 1.7) и Picard (версия 2.26.7).

Для поиска и аннотации полученных вариантов использовали модули GATK (версия 4.2.3.0) и Annotvar соответственно.

Для биоинформатического анализа данных результатов NGS применяли программы и прило-

жения VariantStudio 3.0 (Illumina, США), BaseSpace (Illumina, США) и IGV (Broad Institute, Cambridge).

В целях оценки популяционных частот выявленных вариантов использовали данные международного проекта gnomAD Exomes (ExAC) для экзонных вариантов и базы gnomAD Genomes для интронных вариантов.

Для компьютерной оценки патогенности найденных миссенс-вариантов применяли алгоритмы предсказания патогенности замен аминокислот (SIFT, Polyphen-2, PROVEAN, CADD, REVEL, MetaLR, Mutation Assessor).

В целях оценки клинической релевантности выявленных вариантов использовали базы данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD), Leiden Open Variation Database (LOVD), Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), поисковую систему для геномных вариаций человека varsome.com, базу данных ncbi.nlm.nih.gov/clinvar, руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования, а также литературные данные о клинике ПИД (PubMed) [17, 18].

Выявленные генетические варианты были подтверждены методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру и тщательно сопоставлены с клиническими признаками.

У 16/19 пациентов с выявленными вариантами в генах, которые участвуют в патогенезе ПИД с ауто-сомно-рецессивным типом наследования, было выполнено исследование ДНК родителей для доказательства транс-положения генетических дефектов. У 3 пациентов с клиническим и иммунологическим фенотипом атаксии-телеангиэктазии по причине отсутствия биологического материала одного из родителей данное исследование не проводилось и диагноз ПИД был установлен по клинической картине в соответствии с выявленным нарушением в гене *ATM*.

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы №ИБ-02/2020 «Разработать и внедрить комплексный метод дифференциальной диагностики врожденных дефектов иммунной системы с использованием технологии таргетного секвенирования».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам запусков высокопроизводительного секвенирования 98,1% целевых пар оснований имели как минимум 30-кратное покрытие. Средняя глубина покрытия составила 264,1x.

Патогенные нарушения выявлены у 40/96 пациентов, среди них миссенс, нонсенс, нарушения в

сайтах-сплайсинга и делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания. У 3/96 пациентов выявлены патогенные, однако не описанные в литературе варианты.

По результатам таргетного NGS пациенты были разделены на 7 групп в зависимости от выявленной генетической поломки в гене в соответствии с классификацией ПИД [2]:

1-я группа – пациенты с иммунодефицитами с поражением клеточного и гуморального звена иммунитета ($n = 5$). Данные представлены в *таблице 1*;

2-я группа – пациенты с ПИД с преимущественным дефицитом антител ($n = 7$), данные представлены в *таблице 2*;

Таблица 1
Результаты таргетного NGS в группе комбинированных ПИД

Table 1
The results of targeted next-generation sequencing (NGS) in the group of combined primary immunodeficiencies (PIDs)

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
ADA	NM_000022.4	c.311C>T	p.P104L	Het	AR	ТКИН SCID
		c.478+5_478+10 del GTAGGA	–	Het		
IL2RG	NM_000206.3	c.854 G>T	p.R285L	Hem	XLR	ТКИН SCID
RAG1	NM_001377280.1 NM_001377280.1	c.256_257 del AA	p.K86VfsTer33	Hom	AR	ТКИН SCID
RAG1	NM_001377280.1	c.256_257 del AA	p.K86VfsTer33	Het	AR	ТКИН SCID
		c.1331C>T	p.A444V	Het		
RAG1	NM_001377280.1	c.256_257 del AA	p.K86VfsTer3	Het	AR	ТКИН SCID
		c.983 G>A	p.C328T	Het		

Примечание. Здесь и в таблицах 2–7: Het – гетерозигота; Hem – гемизигота; Hom – гомозигота; AR – аутосомно-рецессивный тип наследования; XLR – X-сцепленный рецессивный тип наследования; ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность.

Notes. Here and in tables 2–7: Het – a heterozygote; Hem – a hemizygote; Hom – a homozygote; AR – autosomal recessive inheritance; XLR – X-linked recessive inheritance; SCID – severe combined immunodeficiency.

Таблица 2
Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с преимущественным дефицитом антител

Table 2
The results of targeted sequencing in the PID group with predominantly antibody deficiency

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
NFKB1	NM_003998.4	c.275G>T	p.G92V	Het	AD	ОВИН CVID
NFKB1	NM_003998.4	c.2575_2579delCTTAT	p.L859GfsTer4	Het	AD	ОВИН CVID
AICDA	NM_020661.4)	c.259T>C	p.C87R	Hom	AR	Имунодефицит с гипер-IgM Immunodeficiency with hyper-IgM
BTK	NM_000061.3	c.1901G>A	p.W634Ter	Hem	XLR	X-АГ XLA
PIK3CD	NM_005026.5)	c.3061G>A	p. E1021K	Het	AD	Имунодефицит с преимущественным дефицитом антител Immunodeficiency with predominantly antibody deficiency
PIK3CD	NM_005026.5)	c.1189G>A	p. V397M	Het	AD	Имунодефицит с преимущественным дефицитом антител Immunodeficiency with predominantly antibody deficiency
PIK3CD	NM_005026.5)	c.859G>C	p. D287H	Het	AD	Имунодефицит с преимущественным дефицитом антител Immunodeficiency with predominantly antibody deficiency

Примечание. Здесь и в таблицах 3, 4, 6: AD – аутосомно-доминантный тип наследования; X-АГ – X-сцепленная агаммаглобулинемия; ОВИН – общая переменная иммунная недостаточность. Полуужирным шрифтом обозначены ранее не описанные варианты.

Notes. Here and in tables 3, 4, 6: AD – autosomal dominant inheritance; XLA – X-linked agammaglobulinemia; CVID – common variable immunodeficiency. Previously unreported genetic variants are highlighted in bold.

3-я группа – пациенты с заболеваниями иммунной дисрегуляции ($n = 10$), подробные данные приведены в таблице 3;

4-я группа – пациенты с комбинированными иммунодефицитами, ассоциированными с синдромальными проявлениями ($n = 9$), данные представлены в таблице 4;

5-я группа – пациенты с врожденными дефектами числа и функции фагоцитов ($n = 1$), данные приведены в таблице 5;

6-я группа – пациенты с дефектами врожденного иммунитета ($n = 3$), данные приведены в таблице 6;

7-я группа – пациенты с аутовоспалительными синдромами ($n = 4$), данные представлены в таблице 7.

Частота встречаемости в популяции выявленных вариантов составляла менее 1%. В соответствии с рекомендациями ACMG, поисковой системой геномных вариаций человека *varsome.com* и базой данных *ncbi.nlm.nih.gov/clinvar*, все мутации относились к вероятно патогенным. Все выявленные варианты относились уже к ранее описанным за исключением 2 вариантов в гене *PIK3CD* (p.V397M, p.D287H) и 1 варианта в гене *XIAP* (p.C227SfsTer17).

У 36/96 пациентов на основании результатов, полученных в ходе исследования, подтвержден иммунологический и клинически предполагаемый диагноз ПИД. У 57/96 пациентов, по данным алгоритмов предсказания патогенности и описания в литературе, выявлены только непатогенные генетические варианты либо варианты с частотой встречаемости минорного аллеля в популяции более 1%.

Согласно опубликованным в литературе данным, использование панелей генов для NGS может обеспечить выявление генетических вариантов от 15 до 70% в зависимости от фенотипов пациентов [19, 20]. Так, по данным W. Rae и соавт., с использованием таргетной панели из 245 генов, участвующих в патогенезе ПИД, в 13/27 случаях выявлены варианты, которые были классифицированы как патогенные/вероятно патогенные и соответствовали фенотипу пациентов [21]. В исследовании A. Bisgin и соавт. генетический вариант, который являлся причиной ПИД, был обнаружен у 17/37 пациентов с использованием таргетной панели, включающей 62 гена [22]. В нашем исследовании у 37/96 пациентов клинический диагноз нашел свое генетическое подтверждение среди исследуемых таргетных

Таблица 3
Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с иммунной дисрегуляцией

Table 3
The results of targeted sequencing in the PID group with immune dysregulation

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
<i>AIRE</i>	NM_000383.4	c.769C>T	p.R257Ter	Hom	AR	Синдром APECED APECED syndrome
<i>CTLA4</i>	NM_005214.5	c.115_139delinGAAAA	p.H39EfsTer14	Het	AD	ИДС с дефектом регуляторных Т-клеток ID with regulatory T cell defect
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Hom	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Het		
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2216_2239del ACACGCTGCATGC CCAGCTGCAGA	p.N739_Q746del	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.576_577delITG	p.F192LfsTer39	Het		
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.2346_2349delGGAG	p.R782SfsTer12	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.576_577delITG	p.F192LfsTer39	Het		
<i>UNC13D</i>	NM_199242.3	c.766C>T	p.R256Ter	Het	AR	Семейный ГЛГ Familial HLH
		c.1828_1829insA	p.R610QfsTer7	Het		
<i>XIAP</i>	NM_001378591.1	c.955 C>T	p.Q319Ter	Hem	XLR	X-сцепленный ЛПС X-linked LPS
<i>XIAP</i>	NM_001378591.1	c.678_681delTTGC	p.C227SfsTer17	Hem	XLR	X-сцепленный ЛПС X-linked LPS
<i>FOXP3</i>	NM_014009.4	c.748_750 del AAG	p.K250del	Hem	XLR	ИДС, поли-эндокринопатия и энтеропатия, сцепленные с X-хромосомой ID, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked

Примечание. APECED – аутоиммунная полиэндокринопатия–кандидоз–эктодермальная дистрофия; ГЛГ – гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; ИДС – иммунодефицитное состояние; ЛПС – лимфопролиферативный синдром.
Notes. APECED – autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy; HLH – hemophagocytic lymphohistiocytosis; ID – immunodeficiency; LPS – lymphoproliferative syndrome.

регионов, таким образом, следует учитывать, что использование метода диагностики, основанного на технологии NGS, может и не выявить генетическую основу заболевания даже у пациентов с явными нарушениями в функционировании иммунной системы ввиду технических ограничений.

Одной из наиболее возможных причин невыявления генетических ассоциаций с клиническим фенотипом является ограниченное количество генов, включенных в нашу целевую панель NGS в сравнении с известными к настоящему времени почти 500 генами, ассоциированными с ПИД, что, вероятно, отразилось на количестве выявленных случаев ПИД в нашем исследовании. Второй причиной является наличие высокомолекулярных регионов или повторов

в последовательностях генов. Третьим ограничением является то, что метод не предназначен для выявления протяженных делеций, инсерций, дупликаций.

Несмотря на вышеупомянутые ограничения, метод выявления генетических нарушений посредством применения технологии NGS представляет собой эффективный и быстрый диагностический подход к ПИД. Преимуществом является одновременное секвенирование множества генов, что приводит к определению истинной причины ПИД. В целом, несмотря на более высокую стоимость реагентов, на данный момент NGS может входить в число исследований первой линии лабораторной диагностики ПИД. Быстрая диагностика демон-

Таблица 4

Результаты таргетного секвенирования в группе комбинированных ПИД с синдромальными проявлениями

Table 4

The results of targeted sequencing in the group of combined PIDs with syndromic features

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
NRAS	NM_002524.5	c.183A>C	p.Q61H	Het	AD	Синдром Нунан Noonan syndrome
ZBTB24	NM_014797.3	c.1222T>G	p.C408G	Hom	AR	Синдром иммунодефицита-центромерной нестабильности-лицевых аномалий Immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome
KRAS	NM_004985.5	c.35G>C	p.G12A	Het	AD	RAS- ассоциированное аутоиммунное лейкопролиферативное заболевание RAS-associated autoimmune leukoproliferative disorder
WAS	NM_000377.3	c.374G>A	p.G125E	Hem	XLR	Синдром Вискотта-Олдрича Wiskott-Aldrich syndrome
WAS	NM_000377.3	c.1453G>A	p.L270P	Hem	XLR	Синдром Вискотта-Олдрича Wiskott-Aldrich syndrome
BLM	NM_001287247.2	c.1642 C>T	p.Q548Ter	Hom	AR	Синдром Блума Bloom syndrome
ATM	NM_000051.4	c.4002_4005 delCTTA	p.H1334FfsTer12	Het	AR	Атаксия-телеангиэктазия Ataxia-telangiectasia
		c.4148 C>A	p.S1383Ter	Het		
ATM	NM_000051.4	c.7307+1 G>;A	-	Het	AR	Атаксия-телеангиэктазия Ataxia-telangiectasia
		c.5932 G>T	p.E1978 Ter	Het		
ATM	NM_000051.4	c.4148 C>A	p.S1383Ter	Het	AR	Атаксия-телеангиэктазия Ataxia-telangiectasia

Таблица 5

Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с врожденными дефектами числа и функции фагоцитов

Table 5

The results of targeted sequencing in the PID group with congenital defects in phagocyte number and function

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
CYBB	NM_000397.4	c.1016C>A	p.P339H	Hem	XLR	X-сцепленная ХГБ X-linked CGD

Примечание. ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь.
Notes. CGD – chronic granulomatous disease.

стрирует неоспоримое клиническое преимущество, позволяя начать соответствующее и часто спасающее жизнь лечение. Тем не менее он также подчеркивает некоторые ограничения и недостатки генных панелей в быстро развивающейся области геномики ПИД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований с использованием таргетной панели, включающей 290 генов, ассоциированных с ПИД, генетиче-

Таблица 6

Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с дефектами врожденного иммунитета

Table 6

The results of targeted sequencing in the PID group with defects in innate immunity

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
STAT1	NM_001384889.1	c. 520T>C	p.C174R	Het	AD/AR	Иммунодефицит с восприимчивостью к микобактериям, тяжелой вирусной инфекции, кожно-слизистому кандидозу Immunodeficiency with susceptibility to mycobacteria, severe viral infections and mucocutaneous candidiasis
STAT1	NM_001384889.1	c.820C>T	p.R274W	Het	AD/AR	Иммунодефицит с восприимчивостью к микобактериям, тяжелой вирусной инфекции, кожно-слизистому кандидозу Immunodeficiency with susceptibility to mycobacteria, severe viral infections and mucocutaneous candidiasis
CXCR4	NM_003467.3	c.1000C>T	p.R334Ter	Het	AD	WHIM-синдром/изолированный миелокатексис WHIM syndrome/isolated myelokathexis

Таблица 7

Результаты таргетного секвенирования в группе ПИД с аутовоспалительными синдромами

Table 7

The results of targeted sequencing in the PID group with autoinflammatory syndromes

Ген Gene	Выявленное генетическое нарушение The identified genetic abnormality			Зиготность Zygosity	Тип наследования Type of inheritance	Клинический и иммунологический фенотип Clinical and immunological phenotype
	Референсная последовательность Reference sequence	На уровне кодирующей последовательности At the coding sequence level	На уровне аминокислотной последовательности At the amino acid sequence level			
ADA2	NM_001282226.2	c. 506G>A	p.R169Q	Het	AR	Васкулит, аутовоспаление, синдром иммунодефицита и гематологических дефектов/синдром Снеддона Vasculitis, autoinflammation, immunodeficiency, and hematologic defects syndrome/Sneddon syndrome
		c. 976G>A	p.G326R	Het		
NLRP12	NM_001277126.2	c.2578 C->T	p. R860W	Het	AD	Семейный холододвой аутовоспалительный синдром Familial cold autoinflammatory syndrome
MVK	NM_001114185.3	c.1129G>A	p.V37I	Het	AR	Синдром гипер-IgD, мевалоновая ацидурия, порокератоз Hyper-IgD syndrome, mevalonic aciduria, porokeratosis
		c.803T>C	p.I268 T	Het		
MVK	NM_001114185.3	c.803T>C	p.I268 T	Het	AR	Синдром гипер-IgD, мевалоновая ацидурия, порокератоз Hyper-IgD syndrome, mevalonic aciduria, porokeratosis

ская причина заболевания была установлена у 37/96 пациентов.

Таким образом, использование технологии NGS может улучшить выявляемость генетической причины ПИД для своевременного установления диагноза.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы «Научно-технологические и технические» на 2021–2025 гг. (подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии», задача 5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Polyakova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0706-6622>

Guryanova I.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9696-3949>

Liubuschkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6127-74104>

Литература

- Белевцев М.В., Жаранкова Ю.С., Алешкевич С.Н., Углова Т.А., Саливончик А.П., Гурьянова И.Е. и др. Первичные иммунодефициты в Республике Беларусь: клинико-эпидемиологический анализ. *Здравоохранение* 2020; 2: 16–31.
- Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfha A., Cunningham-Rundles C., Franco J.L., Holland S.M., et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2022; 42 (7): 1473–507. DOI: 10.1007/s10875-022-01289-3
- Germeshausen M., Zeidler C., Stuhmann M., Lanciotti M., Ballmaier M., Welte K. Digenic mutations in severe congenital neutropenia. *Haematologica* 2010; 95 (7): 1207–10. DOI: 10.3324/haematol.2009.017665
- Abolhassani H., Wang N., Aghamohammadi A., Rezaei N., Nee Lee Y., Frugoni F., et al. A hypomorphic *RAG1* mutation resulting in a phenotype resembling common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134 (6): 1375–80. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.04.042
- Abolhassani H., Cheraghi T., Rezaei N., Aghamohammadi A., Hammarström L. Common variable immunodeficiency or late-onset combined immunodeficiency: a new hypomorphic *JAK3* patient and review of the literature. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2015; 25 (3): 218–20.
- Kebudi R., Kiykim A., Sahin M.R. Primary immunodeficiency and cancer in children: a review of the literature. *Curr Pediatr Rev* 2019; 15 (4): 245–50. DOI: 10.2174/157339631566190917154058
- Oliveira J.B., Fleisher T.A. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (2 Suppl 2): S297–305. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.08.043
- Behjati S., Tarpey P.S. What is next generation sequencing. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2013; 98 (6): 236–8. DOI: 10.1136/archdischild-2013-304340
- Chou J., Ohsumi T.K., Geha R.S. Use of whole exome and genome sequencing in the identification of genetic causes of primary immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12 (6): 623–8. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3283588ca6
- Bamshad M.J., Ng S.B., Bigham A.W., Tabor H.K., Emond M.J., Nickerson D.A., et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12 (11): 745–55. DOI: 10.1038/nrg3031
- Seleman M., Hoyos-Bachilloglu R., Geha R.S., Chou J. Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *Front Immunol* 2017; 8: 847. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00847
- Belkadi A., Bolze A., Itan Y., Cobat A., Vincent Q.B., Antipenko A., et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112 (17): 5473–8. DOI: 10.1073/pnas.1418631112
- Stray-Pedersen A., Sorte H.S., Samarakoon P., Gambin T., Chinn I.K., Akdemir Coban Z.H., et al. Primary immunodeficiency diseases: genomic approaches delineate heterogeneous Mendelian disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139 (1): 232–45. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.05.042
- [Electronic resource] URL: <https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/designstudio.html>. (accessed 28.06.2023).
- Maffucci P., Filion C.F., Boisson B., Itan Y., Shang L.J., Casanova J.L. Genetic diagnosis using whole exome sequencing in common variable immunodeficiency. *Front Immunol* 2016; 7: 220. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00220
- Illumina DNA Prep with Enrichment Reference Guide (Illumina)
- MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (Illumina)
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика* 2019; 18 (2): 3–23.
- Gallo V., Dotta L., Giardino G., Cirillo E., Lougaris V., D'Assante R., et al. Diagnostics of primary immunodeficiencies through next-generation sequencing. *Front Immunol* 2016; 7: 466. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00466
- Cifaldi C., Brigida I., Barzaghi F., Zoccolillo M., Ferradini V., Petricone D., et al. Corrigendum: Targeted NGS Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol* 2019; 10: 1184. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01184
- Rae W., Ward D., Mattocks C., Pengelly R.J., Eren E., Patel S.V., et al. Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. *Clin Genet* 2018; 93: 647–55. DOI: 10.1111/cge.13163
- Bisgin A., Boga I., Yilmaz M., Bingol G., Altintas D. The utility of next-generation sequencing for primary immunodeficiency disorders: experience from a clinical diagnostic laboratory. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 9647253. DOI: 10.1155/2018/9647253

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-185-191

Синдром Швахмана–Даймонда: взгляд гематолога

И.П. Тесаков¹, Е.А. Деордиева¹, Т.Г. Бронтвейн², А.Н. Свешникова^{1,2}¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Синдром Швахмана–Даймонда (СШД) – редкое генетическое заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Наиболее часто (более 90% случаев) развитие СШД связано с наличием биаллельных патогенных вариантов в высококонсервативном гене *SBDS*, локализованном на длинном плече 7-й хромосомы. Тем не менее примерно у 10% пациентов с клиническим фенотипом СШД отсутствуют мутации в *SBDS*, но обнаруживаются патогенные варианты в других генах, например *DNAJC21* или *EFL1*. Заболевание носит мультисистемный характер и отличается экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, белково-энергетической недостаточностью, задержкой физического развития, когнитивными расстройствами, аномалиями костной системы, иммунологическими нарушениями. Кроме описанных симптомов СШД характеризуется наличием явлений костномозговой недостаточности (наиболее часто – нейтропении и анемии), а также повышенным риском появления цитогенетических аномалий и предрасположенностью к развитию миелодиспластических синдромов и острого миелобластного лейкоза. В этой статье авторы поставили перед собой цель описать спектр гематологических нарушений, наблюдаемых при СШД, а также обобщить и актуализировать знания о молекулярных механизмах, лежащих в их основе.

Ключевые слова: синдром Швахмана–Даймонда, ген *SBDS*, врожденная нейтропения, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

Тесаков И.П. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 185–91. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-185-191

Shwachman–Diamond syndrome: a hematologist's view

I.P. Tesakov¹, E.A. Deordieva¹, T.G. Brontveyn², A.N. Sveshnikova^{1,2}¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow²Lomonosov Moscow State University, Moscow

Shwachman–Diamond syndrome is a rare genetic disorder with an autosomal recessive inheritance pattern. Most often (in more than 90% of cases) this disease is caused by biallelic pathogenic variants in the highly conserved *SBDS* gene located on the long arm of chromosome 7. However, approximately 10% of patients with the clinical phenotype of Shwachman–Diamond syndrome lack mutations in *SBDS* but have pathogenic variants in other genes, such as *DNAJC21* or *EFL1*. Shwachman–Diamond syndrome is a multisystemic disorder characterized by exocrine pancreatic insufficiency, protein-energy undernutrition, delayed physical development, cognitive disorders, anomalies of the skeletal system, and immunological disorders. In addition to the described symptoms, Shwachman–Diamond syndrome is characterized by the presence of bone marrow failure (most often neutropenia and anemia), as well as an increased risk of cytogenetic abnormalities and a predisposition to myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. In this review, the authors summarize the spectrum of hematological disorders observed in Shwachman–Diamond syndrome, as well as describe the molecular mechanisms underlying them.

Key words: Shwachman–Diamond syndrome, *SBDS* gene, congenital neutropenia, granulocyte colony-stimulating factor

Tesakov I.P., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 185–91. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-185-191

Впервые описанный в 1964 г. синдром Швахмана–Даймонда (СШД) является редким аутосомно-рецессивным заболеванием, для которого характерна триада клинических проявлений: нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, явления костномозговой недостаточности и наличие скелетных аномалий [1, 2]. Кроме этих симптомов у пациентов с СШД могут наблюдаться различные нарушения со стороны печени, почек и иммунной системы [3–5]. Гематологические проявления СШД заключаются в цитопении различной степени тяжести и повышенном риске развития миелодиспластических синдромов (МДС) и острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) [5].

По данным ряда авторов, СШД является третьей по частоте причиной врожденной костномозговой недостаточности у детей после анемии Фанкони и анемии Даймонда–Блекфена, а также самой частой причиной врожденной панкреатической недостаточности после муковисцидоза [5]. В общемировой популяции распространенность заболевания составляет от 1:50 000 до 1:76 000 новорожденных [6]. Несмотря на то, что заболевание имеет аутосомно-рецессивный характер наследования, у мальчиков СШД встречается в 1,7 раза чаще, чем у девочек [7].

СШД в 90% случаев вызван патогенными вариантами гена *SBDS* (OMIM 607444) [8]. Известно, что продукт гена – белок *SBDS* – преимущественно

© 2023 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 12.09.2022
Принята к печати 26.04.2023

Контактная информация:

Тесаков Иван Павлович,
лаборант-исследователь лаборатории
клеточной биологии и трансляционной
медицины ФГБУ «НИИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ivan.tesakov@yandex.ru

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 12.09.2022

Accepted 26.04.2023

Correspondence:

Ivan P. Tesakov,
research scientist of the Laboratory
of cell biology and translational medicine
of the Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: ivan.tesakov@yandex.ru

локализуется в ядрышках и играет роль в биогенезе рибосом и поддержании стабильности митотического веретена [9]. Тем не менее точные молекулярные механизмы, объясняющие наблюдаемые фенотипические проявления у пациентов с СШД, до конца не известны.

Этиология и патогенез

Высококонсервативный ген *SBDS* локализован на длинном плече 7-й хромосомы (7q11) [6]. Он содержит 5 экзонов и кодирует белок длиной 250 аминокислотных остатков. Псевдоген *SBDSP* гомологичен *SBDS* примерно на 97%, однако содержит делеции и нуклеотидные замены, которые делают невозможным образование полноценного функционального белка. Примерно у 75% пациентов с СШД патогенные варианты *SBDS* возникают вследствие его конверсии с *SBDSP* [8].

К наиболее распространенным патогенным вариантам *SBDS*, выявляемым у пациентов с СШД, относятся мутации с.258+2Т>С и с.183_184delTAinsCT [10]. Первый вариант приводит к нарушениям в донорском сайте сплайсинга во 2-м интроне гена, а второй – к преждевременному образованию стоп-кодона и укорочению белка *SBDS*. Кроме этих 2 генетических вариантов при СШД описаны разнообразные инсерции, делеции и однонуклеотидные замены в гене *SBDS*, однако они встречаются реже [11–13].

Примечательно, что примерно у 10% пациентов с клинической картиной СШД отсутствуют мутации в гене *SBDS*, однако обнаруживаются патогенные варианты в других генах: *DNAJC21* и *EFL1*, белковые продукты которых также задействованы в биогенезе рибосом. Так, в 2016 г. Tummala и соавт. описали 4 пациента с явлениями костномозговой недостаточности, задержкой внутриутробного роста и/или низкорослостью, у которых были обнаружены биаллельные мутации в гене *DNAJC21*. У 1 из этих пациентов развился ОМЛ (вариант М7) в возрасте 12 лет [14]. Позже Stepensky и соавт. описали 6 пациентов с панцитопенией, клинической картиной экзокринной недостаточности поджелудочной железы и скелетными аномалиями, у которых не выявлялись патогенные варианты в гене *SBDS*, однако были обнаружены мутации в гене *EFL1* [15].

Патогенез СШД объясняется нарушением сборки рибосом. Биогенез рибосом является критически важным внутриклеточным процессом, необходимым для роста клетки, ее пролиферации и дифференцировки. Известно, что нарушение транскрипции рибосомальных белков приводит к остановке клеточного цикла, преждевременному старению клетки и ее гибели вследствие апоптоза или аутофагии [16, 17]. Ранее Finch и соавт. продемонстрировали, что белок *SBDS* преимущественно функционирует на поздних

стадиях цитоплазматического созревания 60S-субъединиц рибосом [18]. Белок eIF6 (эукариотический фактор инициации 6) является трансдействующим фактором, удерживающим зарождающуюся субъединицу 60S в функционально неактивном состоянии. Для иницирования трансляции он должен быть удален до того, как субъединица 60S сможет присоединиться к субъединице 40S. Белок *SBDS* способствует высвобождению eIF6, стимулируя ГТФ-азную активность EFL1 (рисунок). Обеспечивая необходимую дестабилизацию связи между рибосомой и eIF6, *SBDS* участвует в правильном формировании 60S-субъединицы рибосомы [18]. Белок *DNAJC21* тоже участвует в созревании 60S до начала сборки 80S [14]. Этим объясняются схожие клинические проявления у пациентов с патогенными вариантами в 3 упомянутых генах.

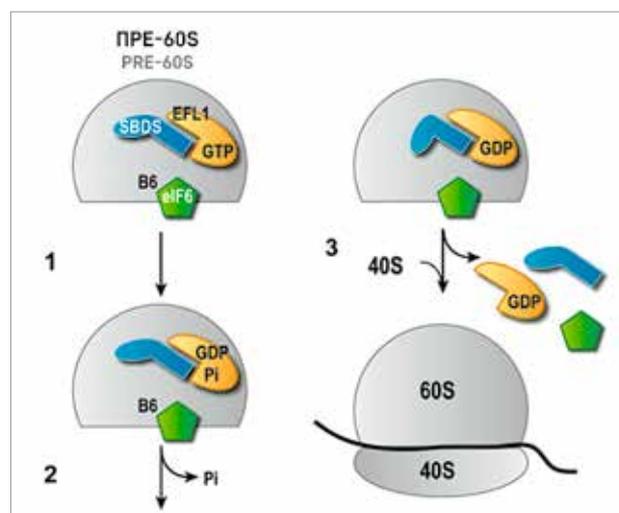
Рисунок

Роль белков *SBDS* и *EFL1* в процессе биогенеза рибосом (адаптировано из [18], с изменениями) 1 – *SBDS* стимулирует гидролиз гуанозинтрифосфата (ГТФ) ГТФ-азой *EFL1*; 2 – после высвобождения неорганического фосфата домен I *SBDS* изменяет свое положение относительно доменов II и III, прямо или косвенно воздействуя на межсубъединичный мостик B6; 3 – это запускает высвобождение eIF6, а также диссоциацию *EFL1* и *SBDS*. Высвобождение eIF6 приводит к формированию функционально активной 80S-рибосомы

Figure

The role of *SBDS* and *EFL1* proteins in ribosome biogenesis (adapted from [18], with changes)

1 – *SBDS* stimulates the hydrolysis of guanosine triphosphate (GTP) by GTPase *EFL1*; 2 – following release of inorganic Pi, domain I of *SBDS* is rotated relative to domains II and III, directly or indirectly disrupting the intersubunit bridge B6; 3 – this triggers the release of eIF6 as well as the dissociation of *EFL1* and *SBDS*. The release of eIF6 leads to the formation of a functionally active 80S ribosome



Помимо своей роли в биогенезе рибосом белок *SBDS* принимает участие в стабилизации веретена деления [9]. Так, в исследовании Orelio и соавт. было установлено, что внутри клетки *SBDS* преимущественно локализуется в ядре, перинуклеарной области и цитоплазме [19]. Кроме того, было показано, что *SBDS* колокализуется с микротрубочками, центрами организации микротрубочек и centrosо-

мами как в гемопоэтических предшественниках, так и в других клеточных линиях, и что SBDS способен *in vitro* связываться с микротрубочками [20]. Более того, была продемонстрирована колокализация SBDS с F-актином в активированных нейтрофилах. Учитывая то, что для пациентов с СШД описаны нарушения поляризации актинового цитоскелета в нейтрофилах в ответ на хемоаттрактанты [21], полученные данные подтверждают, что SBDS играет определенную роль в актин-зависимых клеточных процессах.

Считается, что белок SBDS принимает участие еще в целом ряде внутриклеточных процессов: Fas-индуцируемом апоптозе [22], Rac2-зависимой миграции моноцитов [23], регуляции гомеостаза лизосом [24] и др. Интересно, что одним из последствий снижения экспрессии SBDS является гиперактивация сигнального пути mTOR, что приводит к усилению пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и может предрасполагать к развитию МДС и ОМЛ. В то же время на сегодняшний день отсутствуют убедительные доказательства непосредственного участия белка SBDS в этих процессах, а наблюдаемые изменения могут носить вторичный характер по отношению к нарушению биогенеза рибосом и снижению эффективности трансляции [25].

Белок SBDS экспрессируется в различных клетках организма. В наибольшем количестве он обнаруживается в гемопоэтических клетках, клетках поджелудочной железы, костной ткани, гепатоцитах [9]. Это объясняет характерный спектр клинических проявлений, наблюдаемых у пациентов с СШД.

Гематологические проявления синдрома Швахмана–Даймонда

Цитопения

Для пациентов с СШД характерно наличие признаков костномозговой недостаточности, проявляющихся цитопенией различной степени тяжести. Нейтропения обнаруживается у большинства пациентов (по данным различных авторов, от 88 до 100%) и чаще всего наблюдается с первых лет жизни [26, 27]. Нейтропения обычно носит интермиттирующий характер, при котором возможны колебания числа нейтрофилов от крайне низких значений до нормального уровня. У детей до 1 года клинически значимой нейтропенией считается при снижении абсолютного числа нейтрофилов менее 1000 кл/мкл, а у детей старше 1 года – менее 1500 кл/мкл [28]. Интересно, что у большинства пациентов с СШД могут выявляться дефекты подвижности, миграции и хемотаксиса нейтрофилов [21]. Эти нарушения могут быть связаны с аномальным распределением рецепторов конканавалина А на нейтрофилах [4, 5], а также с нарушениями полимеризации и деполимеризации F-актина, описанными при этом заболевании [21].

Анемия, как правило, легкой степени с низким уровнем ретикулоцитов встречается примерно у 80% пациентов с СШД, носит характер нормохромной и нормоцитарной, но (реже) может быть и макроцитарной [11, 26, 27]. Примерно у 80% пациентов отмечается повышение уровня фетального гемоглобина выше нормы, что может свидетельствовать о стрессовом характере гемопоэза или неэффективном эритропоэзе, связанном с апоптозом клеток еще до выхода из костного мозга.

Тромбоцитопения, определяемая как снижение концентрации тромбоцитов в крови ниже уровня 150 тыс/мкл, наблюдается при СШД несколько реже, чем нейтропения и анемия. По данным различных авторов, она присутствует у 24–88% пациентов [11, 26, 28]. В редких случаях у пациентов может наблюдаться тяжелая тромбоцитопения. В частности, в литературе есть сообщения о летальных исходах у пациентов с СШД из-за кровотечений на фоне глубокой тромбоцитопении [27].

Трехлинейная цитопения наблюдается у 10–65% пациентов. В литературе существуют описания случаев тяжелой аплазии, потребовавшей многократных заместительных трансфузий донорскими компонентами крови [29, 30].

Цитогенетические аномалии

На сегодняшний день хорошо известно, что пациенты с СШД имеют предрасположенность к приобретению нескольких характерных цитогенетических аномалий и появлению соответствующих новых клонов гемопоэза. К наиболее часто встречаемым перестройкам при СШД относят моносомию 7, делецию 7q, образование изохромосомы 7, трисомию 8 и делецию 20q [11, 28]. Обнаружение у пациента моносомии 7, делеции 7q, изохромосомы 7 или трисомии 8 служит угрожающим признаком и обычно свидетельствует о скором прогрессировании до МДС/ОМЛ. Тем не менее некоторые пациенты, у которых ранее была обнаружена изохромосома 7 или делеция 20q, могут являться носителями одной из этих цитогенетических аномалий в течение многих лет, не проявляя симптомов МДС [31].

Предрасположенность к развитию миелодиспластического синдрома/острого миелобластного лейкоза

Как и анемия Фанкони и врожденный дискератоз, СШД относится к группе синдромов предрасположенности к МДС и ОМЛ. Ввиду низкой распространенности заболевания данные о частоте и скорости развития МДС/ОМЛ у пациентов с СШД различаются в разных регистрах. Так, по данным французского регистра, развитие МДС/ОМЛ к 20 годам наблюдается у 18,8% пациентов с СШД, а к 30 годам – у 36,1% [11].

По данным канадского регистра, у пациентов с СШД наблюдается промежуточная кумулятивная частота развития МДС/ОМЛ (18%) по сравнению с другими врожденными синдромами предрасположенности к МДС/ОМЛ: анемией Фанкони (41%), врожденным дискератозом (13%), тяжелой врожденной нейтропенией (10%) и анемией Даймонда–Блекфена (0%) [32]. По данным французского регистра, средний возраст развития МДС/ОМЛ составляет 19 лет [11], по данным канадского регистра, – 20 лет [32].

Для пациентов с СШД в литературе описаны случаи развития различных вариантов ОМЛ: М0, М4, М5 и М6. Острый лимфобластный лейкоз и юношеский миеломоноцитарный лейкоз также могут развиваться у этих пациентов, однако реже, чем ОМЛ. Вариант М6 ОМЛ является самым часто наблюдаемым при СШД и составляет примерно 30% всех случаев лейкозов у этих пациентов [33].

Несмотря на то, что МДС и ОМЛ являются основными причинами смерти при СШД, к сожалению, на сегодняшний день не идентифицированы однозначные факторы риска их развития у таких пациентов. В связи с этим идентификация начальных клональных событий, запускающих лейкемогенез, является крайне важной проблемой с точки зрения разработки инструментов для раннего мониторинга пациентов, находящихся в предлейкемической фазе [34].

В недавнем исследовании Xia и соавт. были продемонстрированы поразительные ассоциации между специфическими соматическими мутациями при 2 различных врожденных нейтропениях с предрасположенностью к МДС/ОМЛ [35]. Так, было показано, что для тяжелой врожденной нейтропении с мутациями в гене *ELANE* характерно появление соматических мутаций в гене *CSF3R*, а для СШД – мутаций в гене *TP53*. Клональный гемопоэз, обусловленный соматическими мутациями *TP53*, наблюдался у 48% пациентов с СШД без признаков МДС на момент исследования, однако не обнаруживался ни у пациентов с мутациями *ELANE*, ни у здоровых добровольцев контрольной группы. У ряда пациентов с СШД обнаруживались множественные мутации *TP53*. Несмотря на отсутствие продольного наблюдения, результаты исследования свидетельствуют о том, что распространенность мутаций *TP53* при СШД имеет тенденцию к увеличению с возрастом [34, 35]. Появление соматических мутаций *TP53* на ранних стадиях клонального гемопоэза (до появления признаков МДС) убедительно свидетельствует о том, что гемопоэтические стволовые клетки с этими мутациями обладают некоторым преимуществом по сравнению с остальными. Обнаружение мутаций *TP53* как раннего признака клонального кроветворения в будущем может стать полезным инструментом для его мониторинга [34].

Негематологические проявления синдрома Швахмана–Даймонда

Как уже было сказано ранее, СШД – мультисистемное заболевание и кроме гематологических проявлений для пациентов характерно наличие ряда других клинических симптомов: экзокринной недостаточности поджелудочной железы, костных аномалий, нарушений функции печени и др.

Панкреатическая недостаточность различной степени выраженности наблюдается у большинства пациентов с СШД [5, 8, 17]. Чаще всего она проявляется с самого рождения в виде учащенного (до 15 раз/сут) разжиженного стула с жирным блеском и зловонным запахом. Как правило, тяжесть недостаточности поджелудочной железы не согласуется с выраженностью гематологических нарушений и скелетных аномалий [7]. В случаях, когда пациент не получает своевременной нутритивной коррекции и адекватной заместительной ферментной терапии, возможно быстрое появление симптомов гиповитаминоза (сухость кожи, рахит, нарушение минерализации костной ткани, геморрагический синдром) вследствие нарушения всасывания жирорастворимых витаминов (А, D, Е, К) [3, 6]. Примечательно, что примерно у трети пациентов с СШД могут наблюдаться признаки пищевой аллергии, что в ряде случаев затрудняет коррекцию нутритивного статуса [7].

Нарушения функции печени в виде гепатомегалии или повышения активности печеночных трансаминаз, по данным литературы, наблюдаются у 50–75% пациентов с СШД. Наиболее часто гепатомегалия наблюдается у маленьких детей и, как правило, проходит с возрастом [13, 36].

Большинство пациентов с СШД также имеют те или иные скелетные аномалии, среди которых наиболее часто встречаются отставание костного возраста, низкорослость, аномалии развития грудной клетки, клинодактилия, гипоплазия фаланг, вальгусная или варусная деформация стоп, сколиоз [20]. Кроме того, для пациентов характерны различные заболевания полости рта и зубов (стоматиты, периодонтиты, кариес), которые могут быть обусловлены как нейтропенией, так и нарушением минерализации эмали зубов [5, 20, 36].

У части пациентов с СШД описано наличие поражений других органов и систем (почки, глаза, кожа, семенники, сердце, нервная система и черепно-лицевые структуры), однако изменения, наблюдаемые в них, не являются специфическими для этого заболевания [11, 15, 31].

Диагностика

СШД представляет собой мультисистемное заболевание, и заподозрить его можно по характерному сочетанию клинических проявлений. Пациентам

необходимо комплексное обследование на предмет наличия нарушений функций органов и систем, наиболее часто поражаемых при этом заболевании.

Выявление признаков костномозговой недостаточности проводится врачом-гематологом. К критериям недостаточности кроветворения относятся следующие лабораторные отклонения: нейтропения (пребывающая или постоянная), тромбоцитопения, гипопролиферативная анемия, макроцитоз, стойкое повышение концентрации фетального гемоглобина, который невозможно объяснить какой-либо другой причиной.

При исследовании костного мозга у пациентов с СШД часто наблюдаются сниженная клеточность, умеренное или большое количество нейтрального жира. Могут встречаться клетки макрофагально-гистиоцитарного ряда (липофаги, макрофаги с «остатками» клеточных элементов, единичные макрофаги с эритрофагоцитозом). Важной особенностью является сужение нейтрофильного ростка, сдвиг гранулоцитопоза влево и задержка созревания нейтрофилов [7, 26]. Также нередкой находкой являются признаки диспоза в нейтрофильном, мегакариоцитарном, эритроидном ростках. Выраженная мультилинейная дисплазия встречается реже и чаще всего свидетельствует о злокачественной миелоидной трансформации. В целом морфология костного мозга при СШД неспецифична, но может помочь дифференцировать это заболевание от других врожденных синдромов костномозговой недостаточности.

Дифференциальную диагностику гематологических проявлений при СШД необходимо проводить с тяжелой врожденной нейтропенией, приобретенными нейтропениями, различными синдромальными заболеваниями (WHIM-синдром, синдром Чедиака–Хигачи, анемия Фанкони, анемия Даймонда–Блекфена, гемобластозы (острый лимфобластный лейкоз, ОМЛ, МДС)) [36].

Для выявления нарушений экзокринной функции поджелудочной железы могут быть использованы тест на панкреатическую эластазу-1 в кале, копрологическое исследование и липидограмма кала. Важно отметить, что для проведения 2 последних необходимы отмена ферментных препаратов и оптимизация питания во время подготовки к исследованию. В связи с этим тест на панкреатическую эластазу-1, параметры которого не зависят от питания и приема панкреатических ферментов, на сегодняшний день нашел более широкое применение в качестве маркера экзокринной недостаточности поджелудочной железы. Также у пациентов с СШД может наблюдаться снижение сывороточной концентрации иммунореактивного трипсиногена и панкреатической амилазы. При проведении ультразвукового исследования для

пациентов с СШД характерны уменьшение размеров поджелудочной железы и диффузная неоднородность ее структуры. Дифференциальную диагностику СШД стоит проводить с другими заболеваниями, сопровождающимися проявлениями панкреатической недостаточности: муковисцидозом, синдромом Шелдона–Рея, муколипидозом II типа, синдромом Пирсона [36].

Для выявления скелетных аномалий помимо объективного осмотра могут применяться различные рентгенологические методы (рентгенография, компьютерная томография, денситометрия). Важно отметить, что задержка физического и полового развития могут влиять на результаты денситометрии, поэтому проводить это исследование целесообразно только после определения костного возраста пациента [36].

При биохимическом исследовании крови у пациентов могут наблюдаться повышение щелочной фосфатазы, признаки синдрома цитолиза (повышение концентрации печеночных трансаминаз) и белково-энергетической недостаточности (гипохолестеринемия, гипопропротеинемия), различные электролитные нарушения [5].

Несмотря на то, что диагноз СШД может быть заподозрен по характерному сочетанию клинических проявлений, окончательно он устанавливается лишь после проведения генетического исследования. Для верификации диагноза первым этапом возможен поиск 2 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *SBDS*: с.183_184delinsCT и с.258+2T>C. Следующим этапом может быть выполнено секвенирование гена *SBDS* в целях поиска более редких генетических вариантов [36].

Лечение

Лечение пациентов с СШД – комплексное мероприятие, в котором участвуют специалисты различных профилей. Для коррекции нарушений, связанных с панкреатической недостаточностью, основную роль играют заместительная терапия препаратами панкреатина и диетотерапия. Кроме того, пациентам необходима супплементация жирорастворимыми витаминами (A, D, E, K) и микроэлементами под контролем их содержания в сыворотке крови [36, 37].

В случае наличия у пациента выраженных скелетных деформаций возможно проведение специального лечения, в ряде случаев – хирургического. Также немаловажным компонентом лечения является разработка и проведение индивидуального комплекса ортопедических мероприятий, направленных как на коррекцию уже существующих проблем, так и на профилактику возникновения новых.

Пациентам, у которых имеется тяжелая нейтропения (менее 500 кл/мкл) или наблюдаются частые рецидивирующие бактериальные или грибковые инфекции на фоне стойкого снижения абсолютного числа нейтрофилов менее 1000 кл/мкл, показана терапия препаратами гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ). Обычно используются схемы терапии, когда препарат вводится подкожно в дозе 2–3 мкг/кг каждые 3–5 дней [37]. Интервалы введения препарата могут как увеличиваться, так и сокращаться. Доза препарата и частота введения определяются врачом-гематологом или врачом-иммунологом индивидуально под контролем показателей гемограммы. Пациентам, получающим терапию Г-КСФ, показано проведение костномозговой пункции с морфологическим и цитогенетическим исследованием клеток каждые 12 мес [37].

Вопрос о точных показаниях к трансплантации костного мозга у пациентов с СШД до конца не решен. Большинство авторов рекомендуют задуматься о проведении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в случае развития у пациента трехростковой цитопении, МДС или острого лейкоза [38]. По данным недавнего крупного исследования Muers и соавт., 5-летняя выживаемость после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток составляет 72% для пациентов с СШД, трансплантированных в связи с развитием серьезных проявлений костномозговой недостаточности (трехростковой цитопении или апластической анемии), и всего 15% для пациентов, трансплантированных по поводу МДС/ОМЛ [38]. Это указывает на необходимость совершенствования подходов к лечению таких пациентов, в частности режимов кондиционирования и профилактики тяжелых посттрансплантационных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы накопилось много новых знаний о молекулярных процессах, лежащих в основе патогенеза СШД, и его характерных клинических и лабораторных проявлениях. Кроме того, были выработаны определенные подходы к мониторингу и лечению пациентов с этим заболеванием. Тем не менее на сегодняшний день остается целый ряд нерешенных вопросов. Прежде всего, не установлено, в каких внутриклеточных процессах белок SBDS принимает прямое участие, а на какие влияет опосредованно. До конца не ясна его роль в гемопоэзе. Кроме того, требуются дальнейшие исследования для более глубокого понимания механизмов лейкомогенной трансформации при СШД, а также уточнения факторов риска развития МДС/ОМЛ и подходов к лечению этих пациентов. Также, несмотря на однозначное увеличение осведомленности врачей-педиатров о характерной клинической и лабораторной картине заболевания, часть пациентов все еще проходят долгий путь до окончательной постановки диагноза. Для своевременной диагностики и эффективного лечения этого редкого заболевания необходимы мультидисциплинарный подход и слаженная работа специалистов самых разных специальностей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Tesakov I.P. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-3449>

Deordieva E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8208-2075>

Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Литература

- Shwachman H., Diamond L., Oski F., Khaw K.-T. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *J Pediatr* 1964; 65: 645–63. DOI: 10.1016/s0022-3476(64)80150-5
- Bodian M., Sheldon W., Lightwood R. Congenital Hypoplasia of the Exocrine Pancreas. *Acta Paediatrica (Stockh)* 1964; 53: 282–93. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1964.tb07237.x
- Mack D., Forstner G., Wilschanski M., Freedman M., Durie P. Shwachman syndrome: Exocrine pancreatic dysfunction and variable phenotypic expression. *Gastroenterology* 1996; 111 (6): 1593–602. DOI: 10.1016/s0016-5085(96)70022-7
- Dror Y., Ginzberg H., Dalal I., Cherepanov V., Downey G., Durie P., et al. Immune function in patients with Shwachman–Diamond syndrome: Immune Profile in Shwachman–Diamond Syndrome. *Br J Haematol* 2001; 114 (3): 712–7. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02996.x
- Dror Y. Shwachman–Diamond syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45 (7): 892–901. DOI: 10.1002/pbc.20478
- Goobie S., Popovic M., Morrison J., Ellis L., Ginzberg H., Boocock G.R.B., et al. Shwachman–Diamond Syndrome with Exocrine Pancreatic Dysfunction and Bone Marrow Failure Maps to the Centromeric Region of Chromosome 7. *Am J Hum Genet* 2001; 68 (4): 1048–54. DOI: 10.1086/319505
- Ginzberg H., Shin J., Ellis L., Morrison J., Ip W., Dror Y., et al. Shwachman syndrome: Phenotypic manifestations of sibling sets and isolated cases in a large patient cohort are similar. *J Pediatr* 1999; 135 (1): 81–8. DOI: 10.1016/s0022-3476(99)70332-x
- Boocock G.R.B., Morrison J.A., Popovic M., Richards N., Ellis L., Durie P.R., Rommens J.M. Mutations in SBDS are associated with Shwachman–Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003; 33 (1): 97–101. DOI: 10.1038/ng1062
- Austin K.M., Gupta M.L., Coats S.A., Tulpule A., Mos-

- toslavsky G., Balazs A.B., et al. Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman–Diamond syndrome. *J Clin Invest* 2008; 118 (4): 1511–8. DOI: 10.1172/JCI33764
10. Woloszynek J.R., Rothbaum R.J., Rawls A.S., Minx P.J., Wilson R.K., Mason P.J., et al. Mutations of the *SBDS* gene are present in most patients with Shwachman–Diamond syndrome. *Blood* 2004; 104 (12): 3588–90. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1516
 11. Donadieu J., Fenneteau O., Beaupain B., Beaufils S., Bellanger F., Mahlaoui N., et al.; Associated investigators of the French Severe Chronic Neutropenia Registry. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman–Diamond syndrome. *Haematologica* 2012; 97 (9): 1312–9. DOI: 10.3324/haematol.2011.057489
 12. Ball H.L., Zhang B., Riches J.J., Gandhi R., Li J., Rommens J.M., Myers J.S. Shwachman–Bodian Diamond syndrome is a multi-functional protein implicated in cellular stress responses. *Hum Mol Genet* 2009; 18 (19): 3684–95. DOI: 10.1093/hmg/ddp316
 13. Nishimura G., Ikegawa S., Makita Y., Masuno M., Ohashi H., Nakashima E., Mabuchi A. Novel *SBDS* mutations caused by gene conversion in Japanese patients with Shwachman–Diamond syndrome. *Hum Genet* 2004; 114 (4): 345–8. DOI: 10.1007/s00439-004-1081-2
 14. Tummala H., Walne A.J., Williams M., Bockett N., Collopy L., Cardoso S., et al. *DNAJC21* Mutations Link a Cancer-Prone Bone Marrow Failure Syndrome to Corruption in 60S Ribosome Subunit Maturation. *Am J Hum Genet* 2016; 99 (1): 115–24. DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.05.002
 15. Stepensky P., Chacón-Flores M., Kim K.H., Abuzaitoun O., Bautista-Santos A., Simanovsky N., et al. Mutations in *EFL1*, an *SBDS* partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman–Diamond like syndrome. *J Med Genet* 2017; 54 (8): 558–66. DOI: 10.1136/jmedgenet-2016-104366
 16. Quin J.E., Devlin J.R., Cameron D., Hannan K.M., Pearson R.B., Hannan R.D. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842 (6): 802–16. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.12.009
 17. Ganapathi K.A., Austin K.M., Lee C.-S., Dias A., Malsch M.M., Reed R., Shimamura A. The human Shwachman–Diamond syndrome protein, *SBDS*, associates with ribosomal RNA. *Blood* 2007; 110 (5): 1458–65. DOI: 10.1182/blood-2007-02-075184
 18. Finch A.J., Hilcenko C., Basse N., Drynan L.F., Goyenechea B., Menne T.F., et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman–Diamond syndrome. *Genes Dev* 2011; 25 (9): 917–29. DOI: 10.1101/gad.623011
 19. Orelia C., Verkuijlen P., Geissler J., van den Berg T.K., Kuijpers T.W. *SBDS* expression and localization at the mitotic spindle in human myeloid progenitors. *PLoS One* 2009; 4 (9): e7084. DOI: 10.1371/journal.pone.0007084
 20. Mäkitie O., Ellis L., Durie P., Morrison J., Sochett E., Rommens J., Cole W. Skeletal phenotype in patients with Shwachman–Diamond syndrome and mutations in *SBDS*. *Clin Genet* 2004; 65 (2): 101–12. DOI: 10.1111/j.0009-9163.2004.00198.x
 21. Orelia C., Kuijpers T.W. Shwachman–Diamond syndrome neutrophils have altered chemoattractant-induced F-actin polymerization and polarization characteristics. *Haematologica* 2009; 94 (3): 409–13. DOI: 10.3324/haematol.13733
 22. Rujkijyanont P., Watanabe K.-I., Ambekar C., Wang H., Schimmer A., Beyene J., Dror Y. *SBDS*-deficient cells undergo accelerated apoptosis through the Fas-pathway. *Haematologica* 2008; 93 (3): 363–71. DOI: 10.3324/haematol.11579
 23. Leung R., Cuddy K., Wang Y., Rommens J., Glogauer M. *Sbds* is required for Rac2-mediated monocyte migration and signaling downstream of RANK during osteoclastogenesis. *Blood* 2011; 117 (6): 2044–53. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282574
 24. Vitiello S.P., Benedict J.W., Padilla-Lopez S., Pearce D.A. Interaction between *Sdo1p* and *Btn1p* in the *Saccharomyces cerevisiae* model for Batten disease. *Hum Mol Genet* 2010; 19 (5): 931–42. DOI: 10.1093/hmg/ddp560
 25. Warren A.J. Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman–Diamond syndrome. *Adv Biol Regul* 2018; 67: 109–27. DOI: 10.1016/j.jbior.2017.09.002
 26. Aggett P.J., Cavanagh N.P., Matthew D.J., Pincott J.R., Sutcliffe J., Harries J.T. Shwachman’s syndrome. A review of 21 cases. *Arch Dis Child* 1980; 55 (5): 331–47. DOI: 10.1136/adc.55.5.331
 27. Kuijpers T.W., Nannenberg E., Alders M., Bredius R., Hennekam R.C.M. Congenital Aplastic Anemia Caused by Mutations in the *SBDS* Gene: A Rare Presentation of Shwachman–Diamond Syndrome. *Pediatrics* 2004; 114 (3): e387–91. DOI: 10.1542/peds.2003-0651-F
 28. Smith O.P., Hann I.M., Chessells J.M., Reeves B.R., Milla P. Haematological abnormalities in Shwachman–Diamond syndrome. *Br J Haematol* 1996; 94 (2): 279–84. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1788.x
 29. Burton G.J., Woods A.W., Jauniaux E., Kingdom J.C.P. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. *Placenta* 2009; 30 (6): 473–82. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.02.009
 30. Barrios N., Kirkpatrick D., Regueira O., Wuttke B., McNeil J., Humbert J. Bone marrow transplant in Shwachman–Diamond syndrome. *Br J Haematol* 1991; 79 (2): 337–8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb04545.x
 31. Valli R., Minelli A., Galbiati M., D’Amico G., Frattini A., Montalbano G., et al. Shwachman–Diamond syndrome with clonal interstitial deletion of the long arm of chromosome 20 in bone marrow: haematological features, prognosis and genomic instability. *Br J Haematol* 2019; 184 (6): 974–81. DOI: 10.1111/bjh.15729
 32. Hashmi S., Allen C., Klaassen R., Fernandez C., Yanofsky R., Shereck E., et al. Comparative analysis of Shwachman–Diamond syndrome to other inherited bone marrow failure syndromes and genotype-phenotype correlation. *Clin Genet* 2011; 79 (5): 448–58. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01468.x
 33. Dror Y., Donadieu J., Koglmeyer J., Dodge J., Toiviainen-Salo S., Mäkitie O., et al. Draft consensus guidelines for diagnosis and treatment of Shwachman–Diamond syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1242: 40–55. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06349.x
 34. Donadieu J., Delhommeau F. TP53 mutations: the dawn of Shwachman clones. *Blood* 2018; 131 (4): 376–7. DOI: 10.1182/blood-2017-11-815431
 35. Xia J., Miller C.A., Baty J., Ramesh A., Jotte M.R.M., Fulton R.S., et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in congenital neutropenia. *Blood* 2018; 131 (4): 408–16. DOI: 10.1182/blood-2017-08-801985
 36. Ипатова М.Г., Георгиева Е.А., Швец О.А., Мухина А.А., Моисеева А.А., Родина Ю.А. и др. Генетические и клинико-лабораторные особенности синдрома Швахмана–Даймонда в России: проспективное исследование. *Вопросы современной педиатрии* 2019; 18 (5): 393–400. DOI: 10.15690/vsp.v18i5.2057
 37. Ипатова М.Г., Куцев С.И., Шумилов П.В., Мухина Ю.Г., Финогенова Н.А., Полякова С.И. и др. Краткие рекомендации по ведению больных с синдромом Швахмана–Даймонда. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2016; 95 (6): 181–6.
 38. Myers K., Hebert K., Antin J., Boulad F., Burroughs L., Hofmann I., et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Shwachman–Diamond Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020; 26 (8): 1446–51. DOI: 10.1016/j.bbmt.2020.04.029

© 2023 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 14.08.2023
Принята к печати 08.09.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-192-198

Эффективность и токсичность лекарственных препаратов L-аспарагиназы в лечении острого лимфобластного лейкоза у детей

Д.С. Смирнова, Т.Т. Валиев

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

Контактная информация:

Валиев Тимур Теймуразович,
д-р мед. наук, заведующий отделением
детской онкологии и гематологии
(химиотерапия гемобластозов) №1
ФГБУ «НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России
Адрес: 115522, Москва,
Каширское шоссе, 23
E-mail: timurvaliev@mail.ru

L-аспарагиназа – противоопухолевый препарат класса ферментов, который одним из первых вошел в протоколы программного лечения острого лимфобластного лейкоза. Он получил широкое распространение благодаря открытию важной особенности метаболизма лейкемических клеток, заключающейся в их высокой потребности в аспарагине для поддержания жизнедеятельности. В клинической практике применяют 3 препарата L-аспарагиназы – нативная *E. coli*-аспарагиназа, пегилированная *E. coli*-аспарагиназа (ПЭГ-аспарагиназа) и нативная *E. chrysanthemi*-аспарагиназа, отличающиеся между собой периодом полувыведения, иммуногенным профилем, спектром и частотой развития токсических эффектов. Одним из основных факторов, ограничивающих применение L-аспарагиназы, является ее высокая иммуногенность, которая обуславливает развитие острых аллергических реакций и феномена скрытой инактивации. Развитие иммунного ответа организма приводит к ускорению клиренса лекарственного препарата и укорочению его периода полувыведения. Контроль эффективности терапии L-аспарагиназой может быть осуществлен благодаря терапевтическому лекарственному мониторингу. Решение вопроса о клинической тактике в случае развития острой реакции гиперчувствительности в ответ на введение препаратов L-аспарагиназы основано на степени тяжести реакции, данных о числе введений у пациента в анамнезе и лабораторном определении активности L-аспарагиназы. Преимущество использования ПЭГ-аспарагиназы в качестве первой линии терапии острого лимфобластного лейкоза у детей обусловлено значительным снижением риска развития острых аллергических реакций, повышением эффективности терапии и, как следствие, улучшением результатов лечения.
Ключевые слова: L-аспарагиназа, пегилированная аспарагиназа, острый лимфобластный лейкоз, терапевтический лекарственный мониторинг

Смирнова Д.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 192–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-192-198

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPO»

Received 14.08.2023
Accepted 08.09.2023

The efficacy and toxicity of L-asparaginase in the treatment of acute lymphoblastic leukemia in children

D.S. Smirnova, T.T. Valiev

The N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Correspondence:

Timur T. Valiev,
Dr. Med. [Sci.], Head of the Department
of Pediatric Oncology and Hematology
(Chemotherapy of Hemoblastosis) No. 1
at the N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 23 Kashirskoye Highway,
Moscow 115522, Russia
E-mail: timurvaliev@mail.ru

L-asparaginase, an enzyme used as an anticancer drug, was one of the first drugs included in the treatment protocols for acute lymphoblastic leukemia. It has become widely used when an important metabolic feature of leukemia cells – their high demand for asparagine to maintain viability – was discovered. Three L-asparaginase preparations are currently used in clinical practice: native *E. coli* asparaginase, pegylated *E. coli* asparaginase (PEG-asparaginase), and native *E. chrysanthemi*-derived asparaginase, which have different half-lives, immunogenic profiles, and the spectrum and frequency of toxic effects. One of the main factors limiting the use of L-asparaginase is its high immunogenicity which can cause acute allergic reactions and the phenomenon of silent inactivation. The development of the immune response leads to an accelerated asparaginase clearance and a shortening of its half-life. To monitor the effectiveness of therapy with L-asparaginase, therapeutic drug monitoring of serum asparaginase activity can be used. When choosing management strategies for patients experiencing acute hypersensitivity reactions to L-asparaginase, the following factors should be taken into consideration: the severity of reaction, the number of previous exposures to L-asparaginase and serum asparaginase activity. The use of PEG-asparaginase is the best first-line treatment strategy for children acute lymphoblastic leukemia, its advantages include a significant reduction in the risk of developing acute allergic reactions, higher therapeutic efficacy and, as a result, improved treatment outcomes.
Key words: L-asparaginase, pegylated asparaginase, acute lymphoblastic leukemia, therapeutic drug monitoring

Smirnova D.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 192–8.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-192-198

Лекарственные препараты L-аспарагиназы включены в схемы полихимиотерапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) с 1960–1970-х годов благодаря открытию уникальных биохимических свойств опухолевых клеток использо-

вать аминокислоту аспарагин для поддержания своей жизнедеятельности. Первые протоколы терапии ОЛЛ с включением L-аспарагиназы позволили повысить бессобытийную выживаемость больных с 31 до 88% [1, 2]. В основе механизма противоопухолевого

действия L-аспарагиназы лежит расщепление аспарагина, служащего критически важным пластическим субстратом для лейкемических клеток. В здоровых клетках организма в условиях дефицита аспарагина активируется фермент аспарагинсинтетаза, восполняющий уровень аминокислоты. В лейкемических клетках экспрессия аспарагинсинтетазы снижена, и недостаток сывороточного аспарагина блокирует биосинтез белков и нуклеиновых кислот, запуская апоптоз [3, 4].

В настоящее время в клинической практике применяют 3 лекарственных препарата на основе L-аспарагиназы – нативную L-аспарагиназу из *Escherichia coli* (*E. coli*), нативную L-аспарагиназу из *Erwinia chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) и пегилированную аспарагиназу из *E. coli*. Данные препараты отличаются по своим фармакокинетическим свойствам и имеют разный период полувыведения, что определяет режимы их введения (таблица) [3]. L-аспарагиназа из *E. chrysanthemi* обладает самым коротким периодом полувыведения, в связи с чем требует наибольшей кратности введений. Пегилированная аспарагиназа – это аспарагиназа из *E. coli*, иммобилизованная на полимерном носителе полиэтиленгликоле (ПЭГ). ПЭГ блокирует потенциальные иммуногенные эпитопы молекулы аспарагиназы, тем самым снижая иммуногенность препарата, в результате чего уменьшается клиренс фермента клетками ретикулоэндотелиальной системы и удлиняется период полувыведения [3, 4].

Начало применения препаратов L-аспарагиназы ознаменовало значительное улучшение результатов терапии ОЛЛ. Современные программы лечения ОЛЛ у детей, включающие в состав комбинированных схем полихимиотерапии L-аспарагиназу, позволяют достичь полной ремиссии у 90–95% пациентов и добиться многолетней бессобытийной выживаемости у 87,3% больных с первичным ОЛЛ [5, 6]. Несмотря на выраженную эффективность терапии, применение L-аспарагиназы несколько ограничено в связи с развитием ряда серьезных нежелательных явлений, таких как влияние на систему коагуляции (гипокоагуляция, тромботические осложнения), гепатотоксичность, панкреотоксичность, вплоть до развития панкреонекроза, нейротоксичность, а также развитие острых реакций гиперчувствительности в ответ на введение (таблица) [3, 4].

L-аспарагиназа по своей природе является микробным ферментом и обладает выраженными антигенными свойствами [10]. В ответ на ее введение происходит иммунный ответ организма, что обуславливает высокую частоту развития аллергических реакций разной степени тяжести. По данным разных исследований, развитие острых реакций гиперчувствительности при введении микробного фермента

развивается у 30–70% пациентов [11]. Развитие реакций гиперчувствительности немедленного типа в клинической практике является поводом для отмены препарата, что снижает эффективность противоопухолевого лечения, ухудшая результаты терапии.

Уникальным иммунологическим феноменом при применении лекарственных препаратов L-аспарагиназы является развитие скрытой аллергии – иммунной реакции организма на препарат, реализующейся без развития клинических проявлений гиперчувствительности немедленного типа [12, 13]. При скрытой аллергии происходит выработка высокоаффинных антител к L-аспарагиназе, инактивирующих фермент и ускоряющих период его полувыведения, вследствие чего снижается активность препарата, и ожидаемый антилейкемический эффект не реализуется в полной мере. По данным одного крупного исследования, развитие скрытой инактивации L-аспарагиназы было зафиксировано у 29% детей с первичным ОЛЛ, получавших терапию для группы высокого риска [14].

Как развитие острых аллергических реакций, так и феномен скрытой аллергии являются важной клинической проблемой в применении препаратов L-аспарагиназы, поскольку дальнейшее использование препарата в таких условиях становится опасным и клинически неэффективным, что в конечном итоге приводит к неудовлетворительным результатам терапии.

Реализация токсических эффектов аспарагиназы детерминирована наличием определенных генетических факторов у пациента. В одном из ретроспективных исследований GWAS, проведенном Северным обществом детской онкологии и гематологии (NOPHO) [15], была исследована генетическая предрасположенность к развитию гиперчувствительности к ПЭГ-аспарагиназе. Был идентифицирован однонуклеотидный полиморфизм в некодируемом участке *CNOT3* на 19-й хромосоме, который обуславливает развитие гиперчувствительности к ПЭГ-аспарагиназе. *CNOT3* является частью комплекса *CCR4-not*, который оказывает регуляторное влияние на экспрессию генов и клеточные сигналы. Блокирование *CNOT3* усиливает транскрипцию молекул главного комплекса гистосовместимости класса II. Также доказана взаимосвязь наличия аллелей генов главного комплекса гистосовместимости *HLA-DRB1*07:01*, *HLA-DQA1*02:01* и *HLA-DQB1*02:02* с высоким риском развития гиперчувствительности к L-аспарагиназе [16].

Согласно данным метаанализа, проведенного рабочей группой по изучению токсичности Понте-ди-Леньо (Италия) с включением данных о 5880 пациентах с впервые установленным ОЛЛ, применение ПЭГ-аспарагиназы в первой линии терапии у детей

Таблица
Фармакокинетика и профиль токсичности препаратов L-аспарагиназы [4, 7–9]

Table
Pharmacokinetics and toxicity profile of L-asparaginase [4, 7–9]

Показатель Indicator	Нативная <i>E. chrysanthemi</i> - аспарагиназа Native <i>E. chrysanthemi</i> as- paraginase	Нативная <i>E. coli</i> -ас- парагиназа Native <i>E. coli</i> as- paraginase	ПЭГ-ас- парагиназа PEG-as- paraginase
Период полувыведения, дни Half-life, days	0,6 ± 0,13	1,28 ± 0,35	5,7 ± 3,2
Истощение аспарагина, дни Asparagine depletion, days	7–15	14–23	26–34
Пик активности, ч Peak asparaginase activity, h	< 24	24–48	72–96
Острая реакция гиперчувствительности, % Acute hypersensitivity reaction, %	10–75	2–24	3–37
Гепатотоксичность, % Hepatotoxicity, %	8	5	4
Панкреатотоксичность, % Pancreatic toxicity, %	10–15	5	4–18
Тромботические осложнения, % Thrombotic complications, %	5	4	3

достоверно снижает частоту развития аллергических реакций до 1–3%. Включение пегилированной формы препарата в программу терапии в постиндукционную фазу является фактором риска развития острых реакций гиперчувствительности [17].

Стоит отметить, что нативная *E. chrysanthemi*-аспарагиназа не обладает перекрестной иммуногенностью с препаратами *E. coli*-аспарагиназы, в связи с чем применяется как терапия второй линии при развитии гиперчувствительности или скрытой аллергии на *E. coli*-аспарагиназу [3, 12].

Терапевтический лекарственный мониторинг

Учитывая высокую иммуногенность препаратов L-аспарагиназы, высокий риск инактивации фермента и снижения эффективности лечения, большое клиническое значение имеет терапевтический лекарственный мониторинг.

Осуществление терапевтического лекарственного мониторинга при применении препаратов L-аспарагиназы возможно посредством измерения уровня сывороточного аспарагина, активности L-аспарагиназы и антиаспарагиназных антител [10, 11].

Измерение уровня сывороточного аспарагина

Измерение уровня аспарагина в сыворотке крови непосредственно отражает каталитическое действие L-аспарагиназы. В норме концентрация аспарагина составляет 40–80 мкмоль/л. Уровень аспарагина, при котором бластные клетки испытывают дефицит и не могут поддерживать свою жизнедеятельность, – 0,1–0,2 мкмоль/л [10]. Однако оценка уровня аспарагина в сыворотке крови пациентов, получающих

терапию L-аспарагиназой, стандартными лабораторными методами представляет определенные технические трудности в связи с продолжающимся гидролизом аспарагина под действием фермента *ex vivo* после забора крови и во время ее центрифугирования [13].

Принимая во внимание технические аспекты лабораторного мониторинга аспарагина (особенности забора, обработки материала, транспортировки, необходимость применения антидотов L-аспарагиназы), оптимизация терапевтического лекарственного мониторинга происходила по пути оценки корреляции между концентрацией аспарагина и активности L-аспарагиназы и определения такого значения активности L-аспарагиназы, при котором достаточный терапевтический эффект может быть достигнут [13].

Оценка активности L-аспарагиназы

Под активностью L-аспарагиназы понимают ее концентрацию в сыворотке крови. Достаточным для элиминации аспарагина считается уровень 0,1 МЕ/мл (по данным разных исследований, данный показатель варьируется от 0,05 до 0,4 МЕ/мл) [10, 13].

Зависимость уровня плазменного аспарагина от активности L-аспарагиназы была изучена в исследовании Children's Oncology Group (COG) AALL07P4 [13]. В исследование включены 58 пациентов, получавших лечение по поводу ОЛЛ в 2008–2010 гг. Была установлена обратная зависимость уровня плазменного аспарагина от активности L-аспарагиназы – элиминация аспарагина была зафиксирована при уровне L-аспарагиназы 0,02–0,1 МЕ/мл. Авторы подчеркивают, что лабораторное исследование уровня аспарагина проводилось строго в соответствии с техническими требованиями и исключало гидролиз аминокислоты *ex vivo*.

Достижение целевого уровня активности L-аспарагиназы является критически важным условием успеха в лечении ОЛЛ. В исследовании COG 2000 г. среди пациентов с рецидивом В-линейного ОЛЛ большую частоту достижения полного ответа на терапию наблюдали в группе пациентов, у которых средний уровень L-аспарагиназы в сыворотке крови был выше [18].

Влияние активности L-аспарагиназы у 65 взрослых пациентов с В-линейным ОЛЛ было оценено в исследовании Cancer and leukemia group B study 9511 [19]. Медиана общей выживаемости среди пациентов, у которых был достигнут уровень циркулирующей аспарагиназы > 0,03 МЕ/мл в течение 14 дней после как минимум 1 введения ПЭГ-аспарагиназы, был выше, чем среди пациентов, у которых уровень был < 0,03 МЕ/мл при каждом введении (31 и 13 мес соответственно).

Применение ПЭГ-аспарагиназы в первой линии терапии ОЛЛ у детей обеспечило стойкое достижение целевого уровня активности L-аспарагиназы в ряде крупных исследований [19–22].

Снижение активности L-аспарагиназы считается достоверным индикатором развития скрытой инактивации препарата [11].

Мониторинг уровня антител к L-аспарагиназе

В основе механизма развития скрытой инактивации лежит иммунный ответ организма на антиген. При введении L-аспарагиназы первичный иммунный ответ приводит к выработке низкоаффинных антител класса IgM циркулирующими В-лимфоцитами. Одновременно антигенпрезентирующие клетки распознают, поглощают пептидные фрагменты лекарственного препарата и представляют его наивным Т-лимфоцитам через экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости классов I и II. Вследствие взаимодействия антиген-специфических Т-хелперов и В-клеток происходит переключение синтеза иммуноглобулинов на высокоаффинные антиаспарагиназные IgE и IgG с последующим формированием долговременного иммунитета В-клетками. Повторное введение L-аспарагиназы активирует плазматические клетки и В-клетки памяти, в связи с чем происходит быстрая секреция специфических антиаспарагиназных антител. IgE связываются с тучными клетками и базофилами, что приводит к высвобождению гистамина и развитию острой реакции гиперчувствительности немедленного типа. В свою очередь, IgG образуют иммунные комплексы с антигеном, в связи с чем происходят инактивация и клиренс L-аспарагиназы [12, 23].

Влияние антиаспарагиназных антител на клиренс L-аспарагиназы и значение их мониторинга в оценке эффективности терапии неоднозначны. В ретроспективном исследовании A. Willer и соавт. в рамках исследования ALL-BFM детерминирован клинически значимый уровень антител к L-аспарагиназе, влияющий на ее активность, – выше 200 Ед/мл. При этом, согласно представленным результатам, при промежуточном титре антиаспарагиназных антител 25–200 Ед/мл на фоне терапии нативной *E. coli*-аспарагиназы переход к ПЭГ-аспарагиназе обеспечивал увеличение активности препарата. Активность *E. chrysanthemi*-аспарагиназы не коррелировала с уровнем антител к *E. coli*-аспарагиназе. Результаты исследования указывают на более низкую иммуногенность ПЭГ-аспарагиназы по сравнению с нативной *E. coli*-аспарагиназой, а также отсутствие перекрестной иммуногенности препаратов *E. coli* с препаратами *E. chrysanthemi* [23].

Е.Н. Panosyan и соавт. в 2015 г. представили результаты лечения пациентов с ОЛЛ группы высокого риска, получавших лечение по протоколу CCG-1961 с 1996 по 2002 г. [14]. Исследование уровня антител к L-аспарагиназе было проведено у 600 пациентов; 368 человек получали ПЭГ-аспарагиназу, из них 105 (28,5%) имели детектируемый титр антител, 263 (71,5%) не имели. Существенных различий в уровне 5-летней бессобытийной выживаемости не выявлено ($80 \pm 2,6\%$ и $77,7 \pm 4,3\%$ соответственно).

В исследовании G. Galindo-Rodríguez и соавт. проведена оценка влияния уровня антител классов IgG и IgE к аспарагиназе на уровень бессобытийной выживаемости [24]. В исследование включен 51 пациент с В-линейным ОЛЛ младше 15 лет, антитела обнаружены в 42 (82%) случаях. В группе пациентов, у которых определялся титр IgG ($n = 10$, 23,8%), наблюдали более низкие показатели бессобытийной выживаемости, чем у пациентов с антителами класса IgE ($n = 18$, 42,8%) и классов IgE и IgG (36 мес против 96 мес). Тем не менее при анализе статистическими методами гипотеза о том, что антитела IgG ускоряют клиренс L-аспарагиназы и ухудшают результаты лечения, не была подтверждена.

Механизмы инактивации L-аспарагиназы до конца не ясны, несмотря на то, что иммунологические аспекты реакции гиперчувствительности хорошо изучены. Отмечено, что ряд пациентов, у которых зафиксирована выработка антиаспарагиназных антител, не имеют проявлений гиперчувствительности и скрытой инактивации [12]. Следовательно, мониторинг уровня антиаспарагиназных антител не обладает достаточной специфичностью, и на данном этапе времени не может применяться в качестве метода терапевтического лекарственного мониторинга при терапии препаратами L-аспарагиназы.

Премедикация как метод преодоления инактивации L-аспарагиназы

Одним из методов преодоления проблемы развития реакций гиперчувствительности в ответ на введение L-аспарагиназы является премедикация препаратами глюкокортикостероидов. Однако роль премедикации неоднозначна, иммуносупрессивный эффект глюкокортикостероидов может ослабить иммунный ответ организма в отношении L-аспарагиназы, препятствуя инактивации лекарственного средства.

Исследование S.L. Cooper и соавт. демонстрирует опыт внедрения универсальной премедикации перед введением ПЭГ-аспарагиназы у 177 пациентов детского возраста, получавших терапию по

поводу ОЛЛ в 2011–2018 гг. В качестве премедикации применяли H1- и H2-гистаминоблокаторы, а пациентам, имеющим в анамнезе развитие реакций гиперчувствительности немедленного типа – гидрокортизон. Премедикация проводилась 68 паци-

ентам. Оценка активности осуществлялась через 7 ± 3 дня после введения ПЭГ-аспарагиназы, при этом средний уровень активности у пациентов, получивших премедикацию, составил 0,9 МЕ/мл. Инактивация препарата, ассоциированная с выработкой

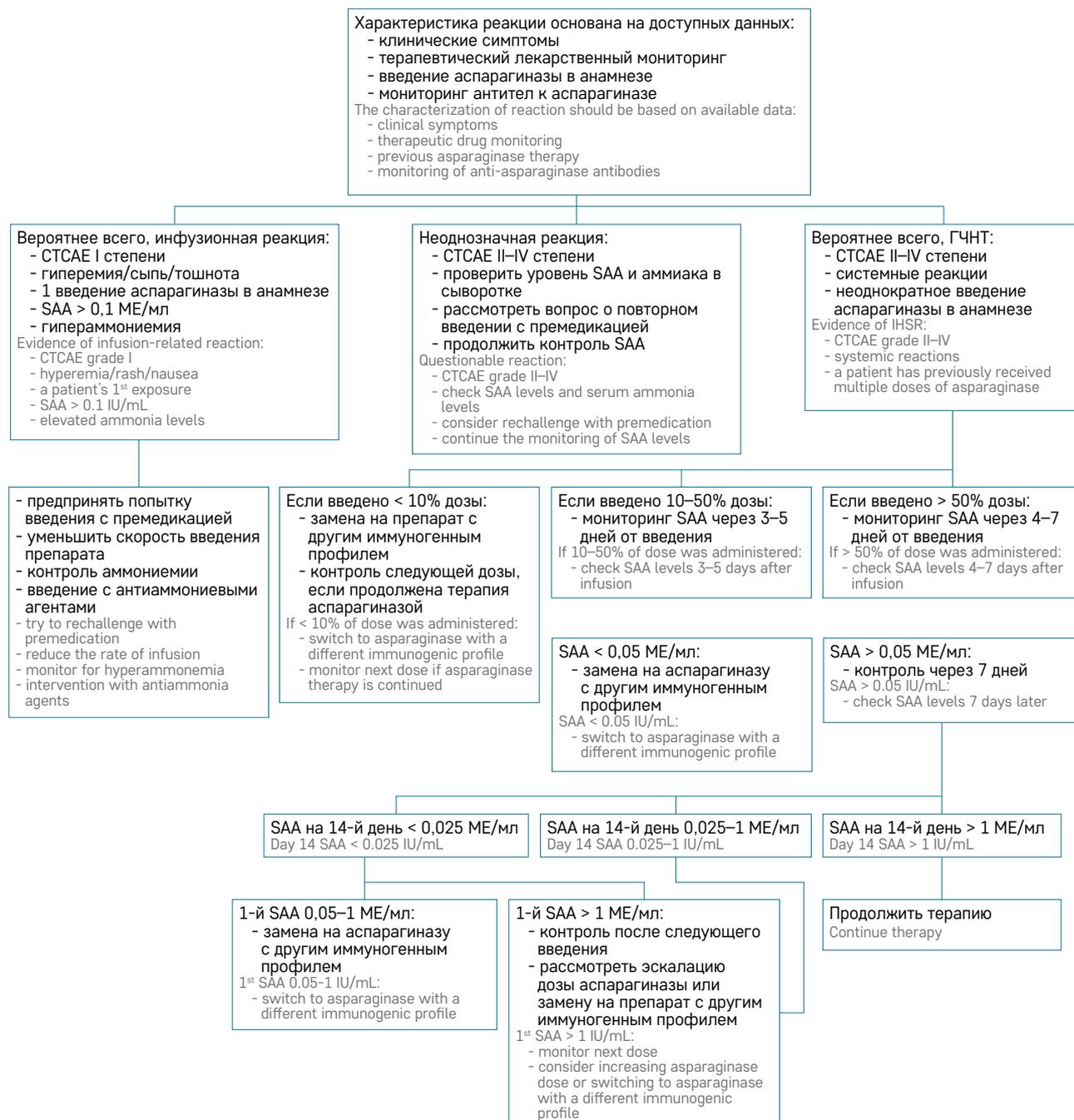
Рисунок

Алгоритм принятия клинического решения при развитии острой реакции на введение L-аспарагиназы [10, 12, 22] ГЧНТ – гиперчувствительность немедленного типа; СТСАЕ – общие критерии нежелательных явлений лекарственных средств, применяемых при терапии злокачественных новообразований; SAA – активность аспарагиназы

Figure

Treatment algorithm following reaction to asparaginase-based therapy [10, 12, 22]

IHSR – immediate hypersensitivity reaction; CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events; SAA – serum asparaginase activity



антиаспарагиназных антител, была отмечена у 2 из 68 пациентов [25].

По данным ряда исследований, препараты глюкокортикостероидов лишь купируют клинические проявления реакции гиперчувствительности, не оказывая влияния на синтез антиаспарагиназных антител и инактивацию L-аспарагиназы. Таким образом, премедикация в качестве метода преодоления инактивации L-аспарагиназы не может быть использована без мониторинга активности L-аспарагиназы [11].

Клиническая тактика при развитии острой реакции гиперчувствительности на введение L-аспарагиназы

Принятие клинического решения при развитии острой аллергической реакции на введение L-аспарагиназы должно быть основано на степени тяжести реакции, числе введений препарата в анамнезе и степени активности L-аспарагиназы [12]. Алгоритм принятия клинического решения представлен на рисунке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препараты L-аспарагиназы являются неотъемлемым компонентом современных схем полихимиотерапии в лечении пациентов с ОЛЛ. В основе противоопухолевого действия L-аспарагиназы лежит гидролиз аминокислоты аспарагина, необходимой для жизнедеятельности лейкоэмических

клеток. В условиях дефицита аспарагина нарушается процесс биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, и происходит апоптоз опухолевой клетки. Являясь микробным ферментом, L-аспарагиназа обладает высокоиммуногенными свойствами. Развитие иммунного ответа организма на введение L-аспарагиназы приводит к инактивации и элиминации лекарственного препарата, что ухудшает результаты лечения. Решением в профилактике развития острых реакций гиперчувствительности, а также предотвращением инактивации L-аспарагиназы может быть премедикация препаратами глюкокортикостероидов, однако их роль неоднозначна. Большое клиническое значение при применении препаратов L-аспарагиназы имеет терапевтический лекарственный мониторинг, который может осуществляться главным образом путем оценки активности L-аспарагиназы. Применение ПЭГ-аспарагиназы в качестве первой линии терапии ОЛЛ у детей демонстрирует более низкий профиль токсичности и высокую эффективность лечения с возможностью достижения 3-летней бессобытийной выживаемости 82% [26].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Smirnova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-2171-1951>

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

Литература

- Sallan S.E., Gelber R.D., Kimball V., Donnelly M., Cohen H.J. More is better! Update of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital childhood acute lymphoblastic leukemia trials. *Haematol Blood Transfus* 1990; 33: 459–66.
- Egler R.A., Ahuja S.P., Matloub Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pharmacol Pharmacother* 2016; 7 (2): 62–71. DOI: 10.4103/0976-500X.184769
- Борсакова Д.В., Синауридзе Е.И. L-аспарагиназа: новые подходы к улучшению фармакологических свойств. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 17 (4): 82–99. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-82-99
- Переводчикова Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. 4-е изд., расширенное и дополненное. М.: Практическая медицина; 2018.
- Malard F., Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2020; 395 (10230): 1146–62. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)33018-1
- Stary J., Zimmermann M., Campbell M., Castillo L., Dibar E., Donska S., et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol* 2014; 32 (3): 174–84.
- Highlights of prescribing information for Oncaspar (pegaspargase). [Electronic resource]: https://www.oncaspar.com/resource/oncaspar_files/prescribing_information.pdf. (accessed 14.08.2023).
- Hijjiya N., van der Sluis I.M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2016; 57 (4): 748–57. DOI: 10.3109/10428194.2015.1101098
- Schmiegelow K., Rank C.U., Stock W., Dworkin E., van der Sluis I. SOHO State of the Art Updates and Next Questions: Management of Asparaginase Toxicity in Adolescents and Young Adults with Acute Lymph-

- oblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2021; 21 (11): 725–33. DOI: 10.1016/j.clml.2021.07.009
10. Asselin B., Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma* 2015; 56 (8): 2273–80. DOI: 10.3109/10428194.2014.100305
 11. Van der Sluis I.M., Vrooman L.M., Pieters R., Baruchel A., Escherich G., Goulden N., et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica* 2016; 101 (3): 279–85. DOI: 10.3324/haematol.2015.137380
 12. Burke M.J., Zalewska-Szewczyk B. Hypersensitivity reactions to asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia: immunology and clinical consequences. *Future Oncol* 2022; 18 (10): 1285–99. DOI: 10.2217/fon-2021-1288
 13. Gentili D., Zucchetti M., Conter V., Masera G., D'Incalci M. Determination of L-asparagine in biological samples in the presence of L-asparaginase. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 657 (1): 47–52. DOI:10.1016/0378-4347(94)80068-5
 14. Schore R.J., Devidas M., Bleyer A., Reaman G.H., Winick N., Loh M.L., et al. Plasma asparaginase activity and asparagine depletion in acute lymphoblastic leukemia patients treated with pegaspargase on Children's Oncology Group AALL07P4. *Leuk Lymphoma* 2019; 60 (7): 1740–8. DOI: 10.1080/10428194.2018.1542146
 15. 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.
 16. Højfeldt S.G., Wolthers B.O., Tulstrup M., Abrahamsson J., Gupta R., Harila-Saari A., et al. Genetic predisposition to PEG-asparaginase hypersensitivity in children treated according to NOPHO ALL2008. *Br J Haematol* 2018; 184 (3): 405–17. DOI: 10.1111/bjh.15660
 17. Kutszegi N., Yang X., Gézsi A., Schermann G., Erdélyi D.J., Semsei Á.F., et al. HLA-DRB1*07:01-HLA-DQA1*02:01-HLA-DQB1*02:02 haplotype is associated with a high risk of asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2017; 102 (9): 1578–86. DOI: 10.3324/haematol.2017.168211
 18. Brigitha L.J., Fiocco M., Pieters R., Albertsen B.K., Escherich G., Lopez-Lopez E., et al.; Ponte di Legno Toxicity Working Group. Hypersensitivity to Pegylated *E.coli* asparaginase as first-line treatment in contemporary paediatric acute lymphoblastic leukaemia protocols: a meta-analysis of the Ponte di Legno Toxicity working group. *Eur J Cancer* 2022; 162: 65–75. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.11.016
 19. Abshire T.C., Pollock B.H., Billett A.L., Bradley P., Buchanan G.R. Weekly poly-ethylene glycol conjugated L-asparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group study. *Blood* 2000; 96: 1709–15.
 20. Wetzler M., Sanford B.L., Kurtzberg J., DeOliveira D., Frankel S.R., Powell B.L., et al. Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 9511. *Blood* 2007; 109: 4164–7.
 21. Dai Z.J., Huang Y.Q., Lu Y. Efficacy and safety of PEG-asparaginase versus *E. coli* L-asparaginase in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Transl Pediatr* 2021; 10 (2): 244–55. DOI: 10.21037/tp-20-178
 22. Panetta J.C., Gajjar A., Hijiya N., Hak L.J., Cheng C., Liu W., et al. Comparison of native *E. coli* and PEG asparaginase pharmacokinetics and pharmacodynamics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86 (6): 651–8. DOI: 10.1038/clpt.2009.162
 23. Tram Henriksen L., Gottschalk Højfeldt S., Schmiegelow K., Frandsen T.L., Skov Wehner P., Schrøder H., et al.; Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology, NOPHO Group. Prolonged first-line PEG-asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL2008 protocol – Pharmacokinetics and antibody formation. *Pediatr Blood Cancer* 2017; 64 (12). DOI: 10.1002/pbc.26686
 24. Ko R.H., Jones T.L., Radvinsky D., Robison N., Gaynon P.S., Panosyan E.H., et al. Allergic reactions and anti-asparaginase antibodies in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: A children's oncology group report. *Cancer* 2015; 121 (23): 4205–11. DOI: 10.1002/cncr.2964
 25. Willer A., Gerss J., König T., Franke D., Kuhnel H.-J., Henze G., et al. Anti-*Escherichia coli* asparaginase antibody levels determine the activity of second-line treatment with pegylated *E. coli* asparaginase: a retrospective analysis within the ALL-BFM trials. *Blood* 2011; 118 (22): 5774–82. DOI: 10.1182/blood-2011-07-367904
 26. 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 (6): 1986–94. DOI: 10.1182/blood.v99.6.1986

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-199-209

Определение минимальной остаточной болезни при В-линейном остром лимфобластном лейкозе методом проточной цитометрии. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей

А.М. Попов¹, Е.В. Михайлова¹, Т.Ю. Вержбицкая², Л.В. Мовчан³, Ж.В. Пермикин², Т.В. Шман³, А.И. Карачунский¹, Г.А. Новичкова¹

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

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Екатеринбург

³ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

Многоцветная проточная цитометрия широко используется в современной лабораторной практике для определения минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с В-линейным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). В данной работе представлены обновленные рекомендации по подходам к определению МОБ при В-линейных ОЛЛ методом проточной цитометрии российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей. Стандарт работы группы включает рекомендации по выбору панели моноклональных антител, пробоподготовке, настройке проточного цитометра, анализу и интерпретации цитометрических данных, формату заключения по результатам исследования. Разработанный подход к мониторингу МОБ позволяет эффективно применять проточную цитометрию для мониторинга В-линейных ОЛЛ у пациентов любых возрастных групп как в локальных лабораториях, так и в рамках крупных многоцентровых исследований.

Ключевые слова: острый В-лимфобластный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия

Попов А.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 199–209. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-199-209

Minimal residual disease monitoring in B-lineage acute lymphoblastic leukemia using flow cytometry. Guidelines of the Russian-Belarusian multicenter group for pediatric acute leukemia studies

A.M. Popov¹, E.V. Mikhailova¹, T.Yu. Verzhbitskaya², L.V. Movchan³, Zh.V. Permikin², T.V. Shman³, A.I. Karachunskiy¹, G.A. Novichkova¹

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

²Regional Children's Clinical Hospital No.1, Ekaterinburg

³The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

Multicolor flow cytometry is now routinely used in laboratory practice for minimal residual disease (MRD) monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). This article describes the methodology of MRD detection in BCP-ALL using flow cytometry as recommended by the Russian-Belarusian multicenter group for pediatric acute leukemia studies. This well-harmonized approach includes recommendations for the choice of monoclonal antibodies, sample preparation, cytometer setup, flow cytometry data analysis and interpretation as well as for reporting. These guidelines allow application of multicolor flow cytometry for MRD monitoring in BCP-ALL in children and adults both in local laboratories and in multicenter settings in prospective clinical trials.

Key words: B-cell acute lymphoblastic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry

Popov A.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 199–209. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-199-209

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 16.06.2023
Принята к печати 14.07.2023

Контактная информация:

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

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 16.06.2023

Accepted 14.07.2023

Correspondence:

Alexander M. Popov, Cand. Med. Sci., Head of Leukemia Immunophenotyping Laboratory at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: uralcytometry@gmail.com

Многоцветная проточная цитометрия широко используется в современной лабораторной практике для определения минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеточных предшественников (ВП-ОЛЛ) [1–3]. К преимуществам метода относятся сравнительно невысокая стоимость исследования и быстрота получения результата, возможность подсчета количества опухолевых клеток в образце, а также комплексной оценки клеточного состава костного мозга (КМ) [4]. Несмотря на сложности полноценной стандартизации [3, 4], методика цитометрического определения МОБ при ВП-ОЛЛ относительно гармонизована в рамках различных исследовательских групп [5–9]. Прогностическое значение МОБ, определенной методом проточной цитометрии, показано для разных протоколов терапии ВП-ОЛЛ у детей и взрослых [10], кроме того, результаты этого исследования проспективно применяются для стратификации пациентов [11–14].

Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) [15–17] потребовало гармонизации методологии определения МОБ в рамках российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей [18]. Данный гармонизованный подход позволил провести анализ прогностического значения мониторинга МОБ в протоколах ОЛЛ-МБ 2008 [19–24] и MLL-Baby [25–27] и выработать рекомендации по применению результатов определения МОБ для стратификации пациентов в дальнейших версиях протоколов.

В данной работе представлены обновленные рекомендации по подходам к определению МОБ при ВП-ОЛЛ методом проточной цитометрии.

Исследуемый материал

Материалом для исследования при определении МОБ должен являться КМ. В отличие от диагностического иммунофенотипирования периферическая кровь не может быть использована для мониторинга МОБ. Результат определения остаточных опухолевых клеток в КМ редко совпадает с таковым в крови [28], особенно учитывая то, что МОБ рассчитывается как процентное содержание остаточных опухолевых клеток среди нормальных ядросодержащих клеток (ЯСК) образца, т. е. на конечный результат влияет количество как собственно остаточных бластов, так и остальных ЯСК. Взятие КМ в объеме не менее 1 мл (желательно не менее 2 мл) осуществляется в пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Так как проточная цитометрия используется для количественного определения МОБ, любое искажение клеточного состава образца КМ приводит к искажению итогового результата. Поэтому, чтобы макси-

мально избежать разведения КМ периферической кровью, предпочтительным для исследования является материал, полученный в самом начале пункции. Все пробирки должны быть промаркированы фамилией и инициалами пациента, равно как и датой взятия материала, а в направлении на иммунофенотипирование указываются фамилия, имя, отчество и возраст пациента, дата и время взятия материала, диагноз, проводимая терапия, точка наблюдения, контактные данные врача, назначившего исследование. Для обеспечения сохранности материал предпочтительно хранить и транспортировать при постоянной температуре 4°C и доставлять в лабораторию не позднее 48 ч после взятия. При наличии видимых сгустков, гемолиза, нарушении температурного режима транспортировки или при факте длительного хранения запрашивается повторный образец. При нарушении маркировки пробирок (несоответствие фамилии направлению, отсутствие маркировки) материал утилизируется, также запрашивается повторный образец. Фильтрация КМ проводится при наличии включений жира и мелких сгустков.

Используемая панель моноклональных антител

Несмотря на четкие отличия между опухолевыми и нормальными клетками в экспрессии различных антигенов [29, 30], в настоящее время не существует единственного маркера, который был бы применим для мониторинга МОБ во всех случаях ОЛЛ [31]. Поэтому для адекватного определения остаточных опухолевых клеток предпочтительно использовать многоцветные комбинации антител, включающие линейно-ассоциированные антигены, маркеры разных стадий дифференцировки клеток и антигены, экспрессия которых на опухолевых клетках часто существенно отличается от таковой на их нормальных аналогах. Попытки упростить подходы к определению МОБ путем сокращения панелей моноклональных антител могут снизить число пациентов, у которых возможно определение МОБ методом проточной цитометрии [32]. С другой стороны, необоснованное увеличение набора определяемых маркеров может приводить к сложностям в настройке приборов и усложнению анализа цитометрических данных [3]. Рекомендуется использование не менее 6-цветной цитометрии (предпочтительно 8-цветная) для мониторинга ВП-ОЛЛ. В *таблице 1* представлены рекомендованные антитела для мониторинга МОБ.

Подбор флуорохрома для каждого конкретного антитела также является критически важным. Ключевые антитела, по которым происходит выделение клеток и среди которых далее производится поиск МОБ (см. ниже), должны быть мечены яркими флуорохромами с хорошим разделением позитивного

Таблица 1

Задачи применения различных антигенов для определения МОБ при CD10⁺ и CD10⁻ ВП-ОЛЛ

Table 1

The purposes of using various antigens for minimal residual disease (MRD) detection in CD10⁺ and CD10⁻ B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)

Маркер Marker	CD10 ⁺ ВП-ОЛЛ CD10 ⁺ BCP-ALL	CD10 ⁻ ВП-ОЛЛ CD10 ⁻ BCP-ALL
CD19	Выделение всех клеток В-линии Identification of all B-lineage cells	Выделение всех клеток В-линии Identification of all B-lineage cells
CD10	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Исключение из анализа нормальных В-клеточных предшественников (ВП) Exclusion of normal B cell precursors (BCPs)
CD20	Выделение опухолевых клеток, исключение из анализа В-лимфоцитов Identification of tumor cells, exclusion of B-lymphocytes	Исключение из анализа нормальных ВП и В-лимфоцитов Exclusion of normal BCPs and B-lymphocytes
CD34	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells
CD58	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells
CD38	Дифференцирование опухолевых клеток от нормальных ВП Differentiation between tumor cells and normal BCPs	Дифференцирование опухолевых клеток от плазмочитов Differentiation between tumor cells and plasmocytes
CD45	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells	Выделение опухолевых клеток Identification of tumor cells

и негативного сигналов (APC, PE, PE-Cy7 и др.). В то же время антитела к антигенам, экспрессируемым с разной интенсивностью различными клетками КМ (CD45, CD38), должны быть мечены флуорохромами с промежуточной интенсивностью свечения (PerCP, APC-Cy7, APC-Alexa750, BV510 и др.), чтобы было возможно получить хорошее разделение популяций среди всех позитивных клеток. Возможно использование комбинаций антител, собранных в специально изготовленные пробирки [33, 34].

Применение CD19-направленной терапии приводит к изменению панели используемых антител, добавлению дополнительных В-линейных антигенов [34].

Пробоподготовка

Имунофенотипирование ОЛЛ производится из одной пробирки с материалом. Если в лабораторию поступило несколько пробирок с КМ, взятым из разных точек пункции, используется одна из них. Выбирается пробирка с наибольшей клеточностью по данным исследования на гематологическом анализаторе.

Используется цельный КМ без дополнительного выделения мононуклеаров. Количество клеток в окрашиваемом образце должно быть достаточным для цитометрического исследования, но в то же время не быть избыточным, так как в этом случае возможен недостаток количества антител для окрашивания всех молекул антигена, что, в свою очередь, будет приводить к неадекватно слабой флуоресценции клеток. Однако следует помнить, что при большом объеме окрашиваемого КМ может быть затруднен лизис эритроцитов стандартным объемом лизирующего реагента. Так как для достижения достаточной чувствительности при определении МОБ рекомендуется анализировать не менее 1 000 000 ЯСК, чаще всего приходится окрашивать

относительно большой объем материала. Для уверенности в том, что в анализируемом образце находится достаточное количество клеток, желательно окрашивать такой объем материала, чтобы количество вносимых клеток существенно превышало целевое количество анализируемых клеток. Внесение материала для окрашивания рекомендуется производить после подсчета клеточности на гематологическом анализаторе и произведения расчетов необходимого объема материала. В случае недостаточной клеточности образца он должен быть использован весь.

Количество вносимых моноклональных антител напрямую зависит от количества клеток в окрашиваемом материале. Оптимальный объем раствора антитела определяется путем титрования и должен позволять получить максимально четкое распределение всех интересующих популяций. Антитела должны вноситься непосредственно из флакона производителя. Заблаговременное приготовление смесей (коктейлей) антител нецелесообразно, так как может привести к распаду относительно нестабильных tandemных флуорохромов.

Лизис эритроцитов проводится в соответствии с инструкциями фирм-производителей соответствующих реагентов. Порядок пробоподготовки определяется особенностями материала. Возможно применение предварительного лизиса эритроцитов в образце до его окрашивания моноклональными антителами раствором без дополнительного фиксатора клеток, однако чаще окрашивание предшествует лизису. Для мониторинга МОБ при ВП-ОЛЛ в отсутствие таргетной иммунотерапии пермеабиллизация и внутриклеточное окрашивание не используются.

Настройка проточного цитометра

Качество иммунофенотипического исследования во многом зависит от настроек используе-

мого прибора. Основными параметрами, влияющими на результат исследования, являются стабильность работы лазеров и жидкостной системы, чувствительность фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) детекторов флуоресценции и цифровая компенсация данных флуоресценции.

Стабильность работы лазеров на большинстве приборов определяется по попаданию показателей их работы в референсные диапазоны. У большинства производителей проточных цитометров существуют системы калибровочных частиц, позволяющие пользователю достаточно легко контролировать работу лазеров и ФЭУ. Персонал лабораторий обязан как минимум еженедельно контролировать стабильность работы лазеров для получения адекватных результатов анализа. Чувствительность ФЭУ жестко привязана к цифровой компенсации данных, поэтому ее настройка производится одновременно с настройкой компенсации. Для настройки компенсации необходимо применять калибровочные материалы, производимые поставщиком проточного цитометра, имеющегося в конкретной лаборатории. При использовании реагентов различных производителей необходимо проводить настройку чувствительности ФЭУ и компенсации для совершенно конкретных комбинаций используемых антител.

Анализ и интерпретация данных

Определение МОБ состоит в выявлении и количественном анализе остаточных опухолевых клеток в пределах лимита детекции проточной цитометрии. В отличие от диагностического иммунофенотипирования, когда необходимо описать и классифицировать очевидную популяцию опухолевых клеток, чаще всего представляющую собой большую часть всех ЯСК в КМ, при выявлении МОБ используется прин-

ципально иной алгоритм, основанный на анализе клеточного состава КМ и выявлении минимальных количеств опухолевых клеток среди большого количества нормальных. Такой подход базируется на двух основных принципах: выявлении клеток с изначально диагностированным иммунофенотипом и клеток, отличающихся по иммунофенотипу от нормальных клеток КМ. Каждый из этих подходов при отдельном использовании имеет существенные недостатки (таблица 2), поэтому в рутинной практике обычно применяется комбинация данных методов, по сути, представляющая собой единый комбинированный подход. При этом, учитывая возможные изменения профиля экспрессии антигенов лейкоэмическими бластами под действием противоопухолевой терапии [35–38], ключевым все же является отличие опухолевых клеток от их нормальных аналогов. Именно такие отличия учитываются прежде всего при оценке инициального иммунофенотипа, поскольку в дальнейшем эти особенности и будут использованы в поиске МОБ.

При определении МОБ при ОЛЛ методом проточной цитометрии позитивными считаются образцы, в которых на точечных графиках определяется группа из 10 клеток и более, имеющих лейкоз-ассоциированный иммунофенотип и значения параметров светорассеяния, соответствующие лимфоцитам/лимфобластам. Максимальная чувствительность метода (анализ 1 000 000 клеток), таким образом, составляет 0,001%. В то же время далеко не во всех случаях клеток в образце достаточно для достижения такой чувствительности. Поэтому минимально достаточной рутинной обычно принято считать чувствительность в 0,01%, для достижения которой необходим анализ 100 000 клеток. Если по тем или иным причинам не удастся собрать мини-

Таблица 2
Преимущества и недостатки двух основных подходов к выявлению остаточных опухолевых клеток

Table 2

The advantages and disadvantages of two main approaches to the identification of residual tumor cells

	Выявление клеток с изначально диагностированным иммунофенотипом Identification of cells with initially diagnosed immunophenotype	Выявление клеток, отличающихся по иммунофенотипу от нормальных клеток КМ Identification of cells with immunophenotype different from that of normal bone marrow cells
Преимущества Advantages	<p>Заранее известные aberrации иммунофенотипа Immunophenotypic aberrations are initially known</p> <p>Возможность применения изначально созданного шаблона анализа данных The initially created data analysis template can be used</p>	<p>Проведение исследования возможно без первичных данных Investigation is possible without initial data</p> <p>Результаты исследования не зависят от изменений иммунофенотипа Test results are not dependent on changes in immunophenotype</p> <p>Результаты исследования менее зависят от выбора антител и флуорохромов Test results are not as dependent on the choice of antibodies and fluorochromes</p>
Недостатки Disadvantages	<p>Не учитываются изменения иммунофенотипа Changes in the immunophenotype are not taken into consideration</p> <p>Зависит от антител и пробоподготовки The approach is dependent on antibodies and sample preparation</p> <p>Применение невозможно при отсутствии первичных данных Application is impossible without source data</p> <p>Расположение нормальных и опухолевых клеток на графиках может пересекаться Normal and tumor cells can overlap on plots</p>	<p>Не учитывается первичный иммунофенотип Initial immunophenotype is not taken into consideration</p> <p>Увеличивается субъективность анализа данных Increased subjectivity of data analysis</p> <p>Распределение нормальных клеток на графиках зависит от типа и этапа терапии The distribution of normal cells on plots depends on the type and stage of therapy</p>

мально достаточное количество клеток, а опухолевые клетки не выявляются, интерпретация результатов такого исследования считается невозможной (см. раздел «Формат заключения»).

Величина МОБ при определении методом проточной цитометрии рассчитывается как процентное содержание опухолевых клеток среди всех ЯСК КМ. При этом для идентификации опухолевых клеток могут использоваться различные варианты комбинаций антител, а итоговым уровнем МОБ считается максимальное количество, полученное в одной из пробирок. Для выделения ЯСК в образце рекомендуется применение ДНК-тропного красителя, окрашивание которым позволяет четко отделить ЯСК от всех случайно зафиксированных цитометром событий. Чаще всего для этих целей используются красители SYTO16 (канал FITC проточного цитометра) или SYTO41 (канал Pacific Blue). Предпочтительным является добавление ДНК-тропного красителя прямо в пробирку, в которой проводится определение МОБ. В этом случае выделение CD19⁺-клеток производится только среди SYTO⁺. Если же такой возможности нет, рекомендуется провести дополнительное окрашивание SYTO/CD19/CD45. Однако наиболее точное выделение ЯСК возможно только при их последовательном выделении по SYTO-позитивности, «очистке» полученной клеточной популяции от видимого дэбриса по значению прямого и бокового светорассеяния (график FSC/SSC) и выделении синглетов (удаление конгломератов клеток, способных давать завышенные значения флуоресценции). Эта итоговая совокупность клеток и становится знаменателем при расчете величины МОБ. Категорически неприемлемым является выделение региона анализа по экспрессии CD45, поскольку, во-первых, это может существенно осложнить выявление CD45⁻-опухолевых клеток, а, во-вторых, исключит из количества ЯСК эритроидные предшественники, что может исказить итоговую величину МОБ при расчете.

Выделение В-клеточного региона производится по экспрессии CD19 и характерным для лимфоидных клеток значениям параметра бокового светорассеяния (SSC). В этот регион кроме собственно гипотетически присутствующих остаточных опухолевых клеток попадают зрелые В-лимфоциты, нормальные ВП (только CD19⁺, но не более ранние), плазматические клетки (ПК) и в небольшом количестве результаты неспецифического связывания антитела к CD19. При определении МОБ важно понимать, какие нормальные клетки В-линейной дифференцировки могут обнаруживаться в КМ на каждом этапе лечения [29]. Так, во время индукционной терапии нормальные ВП в КМ отсутствуют [32, 39, 40], однако к концу данного этапа уже могут обнаруживаться в видимых количествах [32, 41]. Время появления в

КМ нормальных ВП зависит в том числе и от состава индукционной терапии (перечня препаратов и режима их введения) и может различаться не только при применении протоколов с разной интенсивностью терапии, но даже в разных рукавах рандомизации, предусматривающих разный состав индукции [41]. На этапах консолидации/интенсификации и поддерживающей терапии нормальные ВП выявляются в подавляющем числе образцов [32, 40].

Антигенный профиль нормальных В-лимфоидных клеток КМ детально описан ранее [29, 30]. Также четко представлены типичные отличия опухолевых клеток от нормальных и возможные места расположения остаточной лейкоэмической популяции на двухпараметрических точечных графиках [29]. Тем не менее не существует какого-либо отдельного маркера, который бы во всех случаях экспрессировался аберрантно и позволял всегда отличать опухолевые клетки от всех возможных нормальных [31]. Поэтому для точного выявления и количественной оценки МОБ всегда используется анализ сочетаний нескольких маркеров, зачастую сводящийся к последовательному исключению различных популяций нормальных элементов В-клеточного развития в соответствии с особенностями их иммунофенотипа. Анализ В-линейного региона в целом имеет некоторые особенности в зависимости от инициальной экспрессии CD10 на лейкоэмических бластах [18], однако всегда достаточно индивидуален. Его принципиальная схема показана на *рисунке 1*. Проводится анализ точечных графиков, которые наиболее четко отражают возможные различия опухолевых и нормальных клеток, в том числе и регенераторных (например, отображающих экспрессию CD10 и какого-либо другого антигена), однако в итоге выбирается та последовательность анализа экспрессии антигенов, которая позволяет наиболее четко отделить всю остаточную опухолевую популяцию от всех нормальных клеток в В-клеточном регионе. Пример выявления остаточных опухолевых клеток на фоне выраженной регенерации В-линейной составляющей КМ представлен на *рисунке 2*. Необходимость в первую очередь оценки экспрессии CD10 в сочетании с другими антигенами не вызывает сомнений. Пример важности такого алгоритма анализа представлен на *рисунке 3*.

Выделенные по соответствующему антигенному профилю опухолевые клетки должны быть проанализированы при помощи так называемого обратного гейтирования, т. е. проверки правомочности включения всех выделенных клеток как в регион CD19⁺-клеток, так и вообще в совокупность клеток, не находящихся в апоптозе. Это делается на графиках CD19/SSC и FSC/SSC соответственно. Примеры полного анализа цитометрических данных для выяв-

Рисунок 1

Принципиальный алгоритм анализа данных проточной цитометрии для мониторинга МОБ при CD10⁺- и CD10⁻-вариантах ВП-ОЛЛ

Figure 1

An algorithm for the analysis of flow cytometry data for MRD monitoring in CD10⁺ and CD10⁻ BCP-ALL

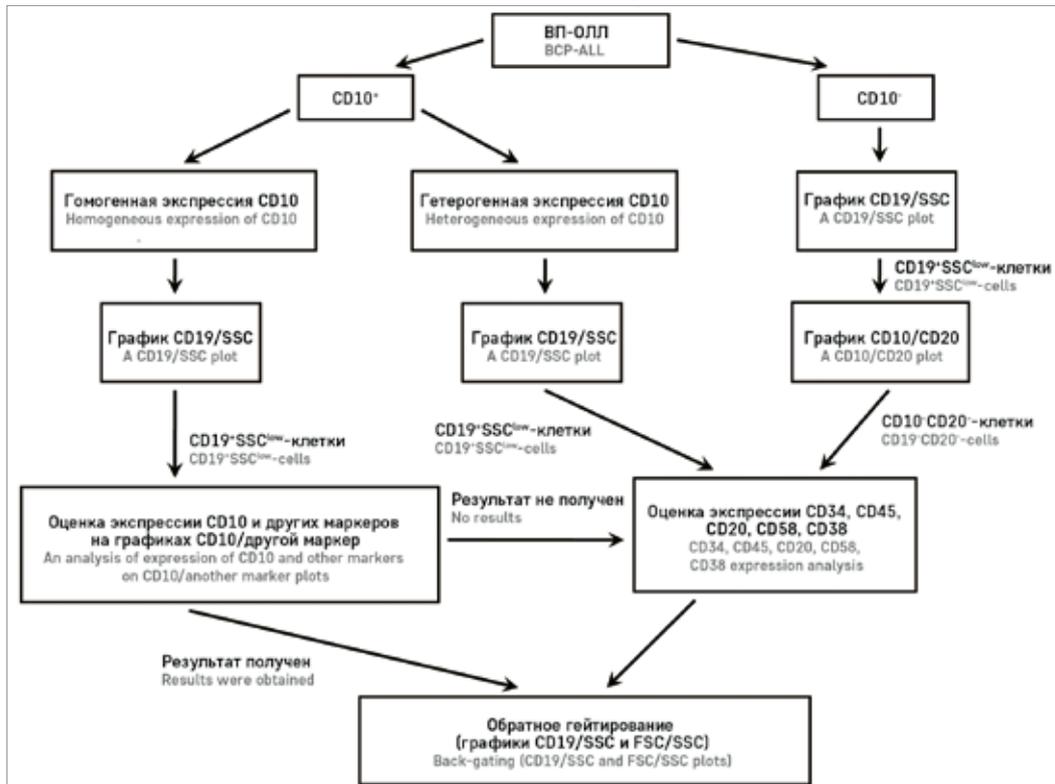


Рисунок 2

Пример выявления остаточных опухолевых клеток на фоне выраженной В-линейной регенерации, основанно-го на четких различиях антигенного профиля нормальных и опухолевых ВП

Figure 2

Identification of residual tumor cells during active B-cell regeneration based on clear-cut differences in the antigenic profiles of normal and neoplastic BCPs

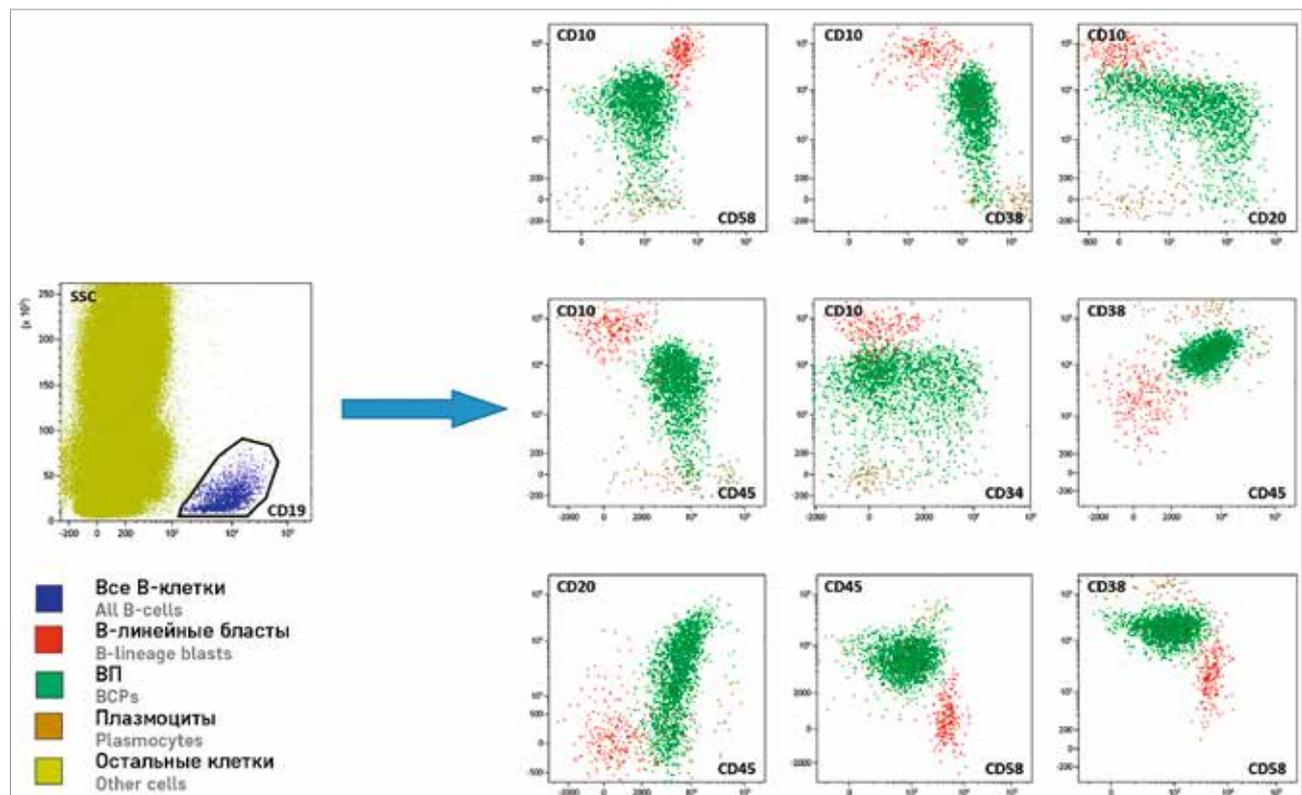
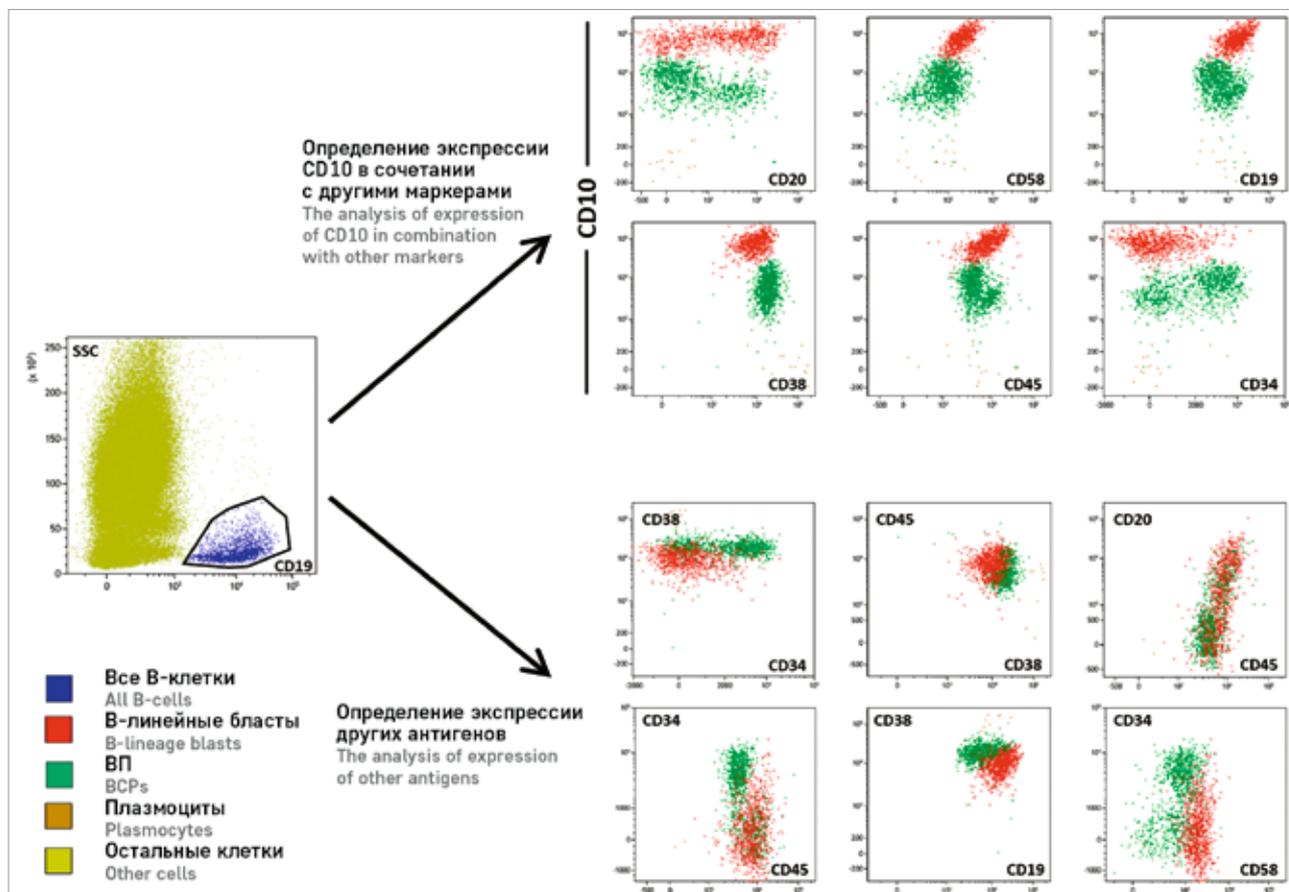


Рисунок 3

Пример выявления остаточных опухолевых клеток на фоне выраженной В-линейной регенерации, демонстрирующий возможность четкого выделения МОБ именно на основе экспрессии CD10, в то время как различия в экспрессии сочетаний других антигенов не столь очевидны

Figure 3

Identification of residual tumor cells during active B-cell regeneration. Here, it is shown that accurate MRD detection is possible based specifically on CD10 expression, while differences in the expression of combinations of other antigens are not so obvious



ления МОБ на 36-й день терапии (окончание индукционной терапии протокола ОЛЛ-МБ 2015) у детей с CD10⁺ и CD10 ВП-ОЛЛ представлены на *рисунке 4* и *рисунке 5* соответственно.

Клиническая интерпретация результатов определения МОБ может быть проведена только по совокупности всех клинических и лабораторных данных, а также с учетом используемого протокола терапии и возможностей дальнейшей модификации лечения. Обычно она производится даже не напрямую лечащим врачом, а в рамках коллегиального обсуждения клинических и лабораторных специалистов, а также представителей мультицентровой кооперативной группы того протокола, по которому пациент получает лечение. Продолжительность мониторинга МОБ целиком определяется правилами протокола терапии и научного исследования, в рамках которых проводится ее определение. Пример долгого сохранения МОБ на фоне химиотерапии с дальнейшим достижением МОБ-негативности после применения CD19-направленной иммунотерапии показан на *рисунке 6*.

Формат заключения

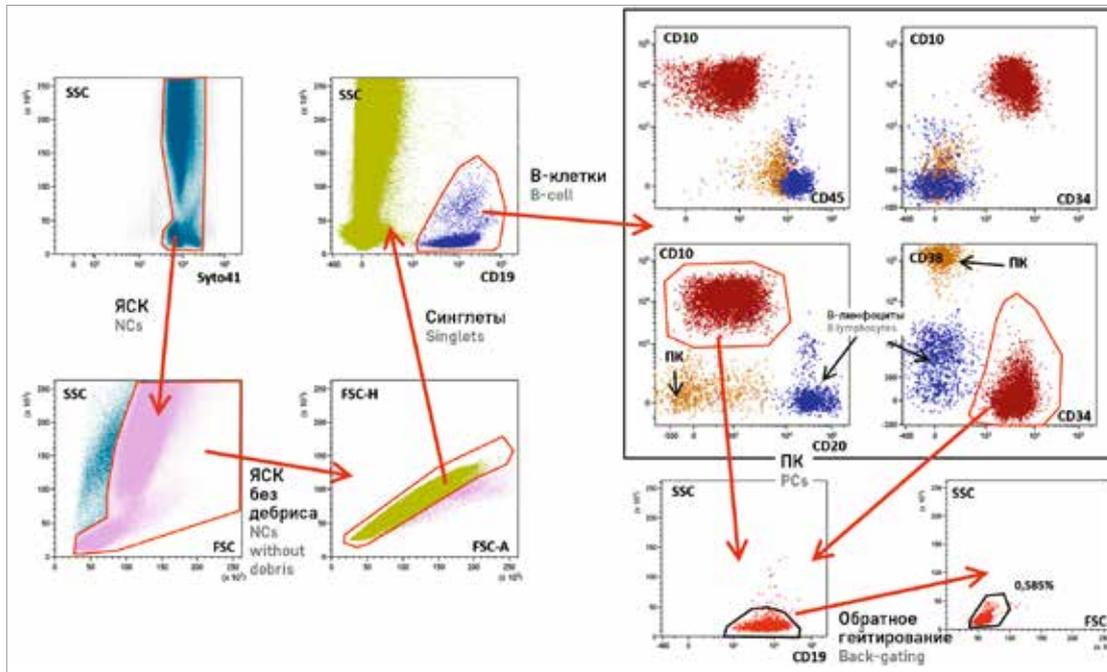
Заключение, выдаваемое по результатам проведенного исследования, кроме стандартных данных пациента должно также содержать информацию о проводимой терапии и этапе лечения. Как и при первичном иммунофенотипировании, заключение должно быть максимально кратким и информативным и не содержать ни ненужной для клинической интерпретации количественной информации, ни каких-либо текстовых рассуждений описательного характера. Помимо процентного содержания опухолевых клеток в заключении также рекомендуется указывать процентное содержание нормальных ВП в образце для исключения подозрения на рецидив на основании данных миелограммы в случае накопления в КМ большого количества регенераторных бластных клеток. Не рекомендуется отдельно указывать индивидуальную чувствительность определения МОБ в данном образце, поскольку это не несет никакой содержательной клинической информации, однако может вызывать дополнительные сложности при интерпретации заключения лечащим доктором.

Рисунок 4

Пример полного анализа цитометрических данных для выявления МОБ на 36-й день терапии (окончание индукционной терапии по протоколу ОЛЛ-МБ 2015) у пациента с CD10⁺ ВП-ОЛЛ
 Популяции клеток при последовательном выделении обозначены разными цветами, финальная опухолевая популяция показана красным. Отдельно цветами показаны зрелые В-лимфоциты и ПК

Figure 4

A complete analysis of flow cytometry data for MRD detection on Day 36 of treatment (the end of induction therapy in accordance with the ALL-MB-2015 protocol) in a patient with CD10⁺ BCP-ALL
 Sequentially identified cell populations are represented by different colors, the final tumor population is shown in red. Mature B-lymphocytes and plasma cells (PCs) are represented by separate colors. NCs – nucleated cells

**Рисунок 5**

Пример полного анализа цитометрических данных для выявления МОБ на 36-й день терапии (окончание индукционной терапии протокола ОЛЛ-МБ 2015) у пациента с CD10⁻ ВП-ОЛЛ
 Популяции клеток при последовательном выделении показаны разными цветами, финальная опухолевая популяция обозначена красным. Отдельно цветом показаны ПК. НС – результаты неспецифического связывания антител

Figure 5

A complete analysis of flow cytometry data for MRD detection on Day 36 of treatment (the end of induction therapy in accordance with the ALL-MB-2015 protocol) in a patient with CD10⁻ BCP-ALL
 Sequentially identified cell populations are represented by different colors, the final tumor population is shown in red. PCs are represented by a separate color. NSB – the results of non-specific binding of antibodies

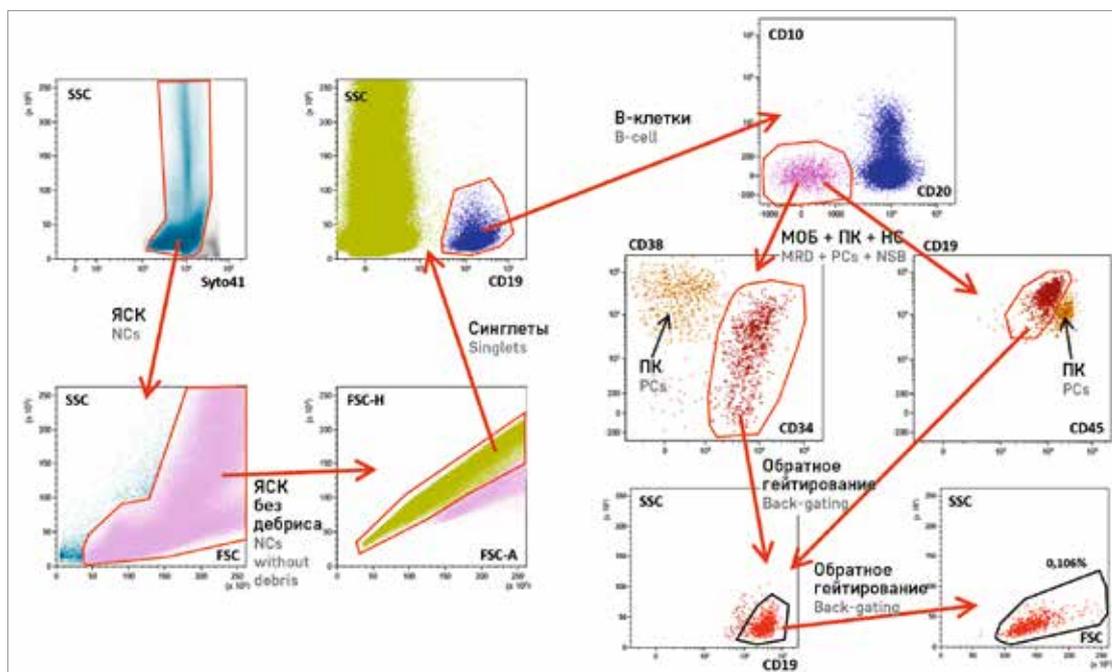
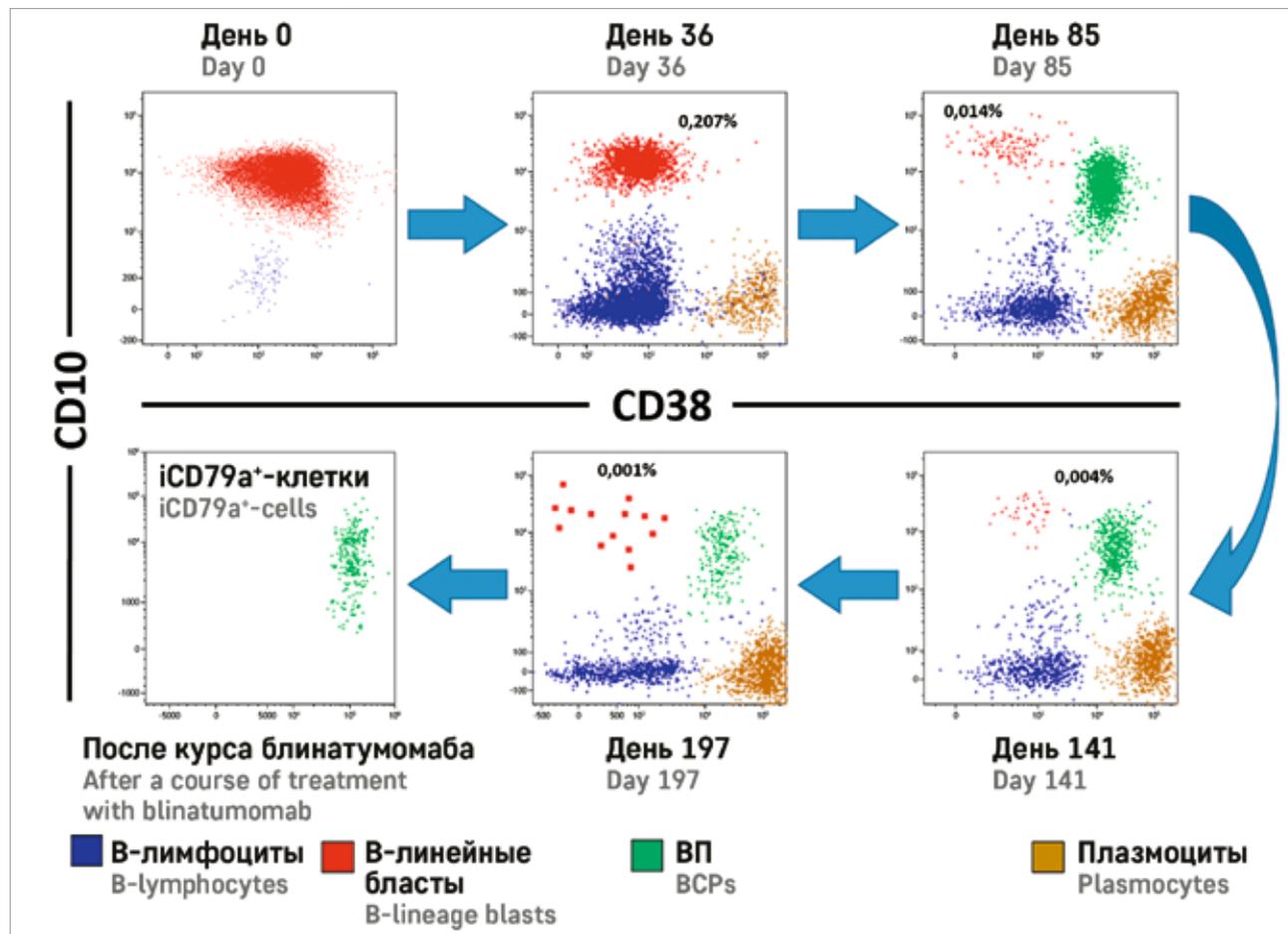


Рисунок 6

Пример долгого сохранения МОБ на фоне химиотерапии (протокол ОЛЛ-МБ 2015) с дальнейшим достижением МОБ-негативности после применения CD19-направленной иммунотерапии (блинатумомаб)
 Отображены только CD19⁺-клетки (на последнем графике – iCD79a⁺-клетки)

Figure 6

Long-term persistence of MRD during chemotherapy (according to the ALL-MB-2015 protocol) with eventual achievement of MRD negativity following CD19-targeted immunotherapy (blinatumomab)
 Only CD19⁺-cells are shown (the last graph shows iCD79a⁺-cells)



Подразумевается, что минимальная чувствительность достигнута для МОБ-негативного результата и не имеет значения для МОБ-позитивного (см. выше). В случае недостаточной клеточности образца и, как следствие, невозможности достичь необходимой чувствительности при негативном результате исследования данная недостаточная чувствительность должна быть отражена в комментариях к заключению. В случае, если дальнейшим этапом терапии для пациента предполагается использование таргетных препаратов, экспрессия потенциальных терапевтических мишеней также должна быть указана в заключении в необходимом формате (процентное содержание позитивных клеток или среднее количество молекул на клетку). Клиническая интерпретация результатов определения МОБ в рамках заключения по проведению исследования недопустима.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в данной работе подходы к мониторингу МОБ позволяют эффективно применять проточную цитометрию для оценки ВП-ОЛЛ у пациентов любых возрастных групп как в локальных лабораториях, так и в рамках крупных многоцентровых исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

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

Mikhailova E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3450-0498>

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

Karachunskiy A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9300-5198>

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

Литература

- DiGiuseppe J.A., Wood B.L. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2019; 96 (4): 256–65.
- Chen X., Wood B.L. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: Treatment and prognosis? *Best Pract Res Clin Haematol* 2017; 30 (3): 237–48.
- Van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125 (26): 3996–4009.
- Brüggemann M., Schrauder A., Raff T., Pfeifer H., Dworzak M., Ottmann O.G., et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia* 2010; 24 (3): 521–35.
- Keeney M., Wood B.L., Hedley B.D., DiGiuseppe J.A., Stetler-Stevenson M., Paietta E., et al. A QA Program for MRD Testing Demonstrates That Systematic Education Can Reduce Discordance Among Experienced Interpreters. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94 (2): 239–49.
- Maurer-Granofszky M., Schumich A., Buldini B., Gaipa G., Kappelmayer J., Mejstrikova E., et al. An Extensive Quality Control and Quality Assurance (QC/QA) Program Significantly Improves Inter-Laboratory Concordance Rates of Flow-Cytometric Minimal Residual Disease Assessment in Acute Lymphoblastic Leukemia: An I-BFM-FLOW-Network Report. *Cancers (Basel)* 2021; 13 (23): 6148.
- Theunissen P., Mejstrikova E., Sedek L., van der Sluijs-Gelling A.J., Gaipa G., Bartels M., et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017; 129 (3): 347–57.
- Dworzak M.N., Gaipa G., Ratei R., Veltroni M., Schumich A., Maglia O., et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74 (6): 331–40.
- Borowitz M.J., Wood B.L., Keeney M., Hedley B.D. Measurable Residual Disease Detection in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: The Children's Oncology Group (COG) Method. *Curr Protoc* 2022; 2 (3): e383.
- Berry D.A., Zhou S., Higley H., Mukundan L., Fu S., Reaman G.H., et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2017; 3 (7): e170580.
- Pui C.H., Pei D., Coustan-Smith E., Jeha S., Cheng C., Bowman W.P., et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. *Lancet Oncol* 2015; 16 (4): 465–74.
- Borowitz M.J., Wood B.L., Devidas M., Loh M.L., Raetz E.A., Salzer W.L., et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* 2015; 126 (8): 964–71.
- Modvig S., Hallbook H., Madsen H.O., Siitonen S., Rosthoj S., Tierens A., et al. Value of flow cytometry for MRD-based relapse prediction in B-cell precursor ALL in a multicenter setting. *Leukemia* 2021; 35 (7): 1894–906.
- Toft N., Birgens H., Abrahamson J., Giskevicius L., Hallbook H., Heyman M., et al. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1–45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2018; 32 (3): 606–15.
- Румянцев А.Г., Карачунский А.И. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2009; 88 (4): 19–27.
- Паровичникова Е.Н., Алешина О.А., Троицкая В.В., Чабаева Ю.А., Соколов А.Н., Исинова Г.А. и др. Сравнение результатов лечения взрослых больных острыми Ph-негативными лимфобластными лейкозами по протоколам Российских многоцентровых исследований «ОЛЛ-2009» и «ОЛЛ-2016». *Гематология и трансфузиология* 2022; 67 (4): 460–77.
- Цаур Г.А., Ригер Т.О., Попов А.М., Кустанович А.М., Ольшанская Ю.В., Наседкина Т.В. и др. Прогностическая роль различных перестроек 11q23/KMT2A у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2021; 20 (1): 27–39.
- Попов А.М., Белевцев М.В., Боякова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Е.В., Фадеева М.И. 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.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. One-point flow cytometric MRD measurement to identify children with excellent outcome after intermediate-risk BCP-ALL: results of the ALL-MB 2008 study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2023; 149 (8): 4629–37.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. A single flow cytometric MRD measurement in children with B-lineage acute lymphocytic leukemia and hyperleukocytosis redefines the requirements of high-risk treatment: Results of the study ALL-MB 2008. *Leuk Res* 2022; 123: 106982.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. A simple algorithm with one flow cytometric MRD measurement identifies more than 40% of children with ALL who can be cured with low-intensity therapy. The ALL-MB 2008 trial results. *Leukemia* 2022; 36 (5): 1382–5.
- Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Verzhbitskaya T., Boyakova E., et al. Flow cytometric MRD at the end of consolidation in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia has significant prognostic value but limited clinical implica-

- tions: Results of study ALL-MB 2008. *Leuk Res* 2022; 125: 106998.
23. Popov A., Henze G., Roumiantseva Y., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. Low-intensity therapy cures over 40% of children with rapid Flow-MRD responding ALL: the ALL-MB 2008 trial results. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2022; 21 (2): 95–104.
 24. Popov A., Henze G., Roumiantseva J., Budanov O., Belevtsev M., Verzhbitskaya T., et al. A simple procedure to identify children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia who can be successfully treated with low or moderate intensity: Sequential versus single-point minimal residual disease measurement. *Pediatr Blood Cancer* 2023; 70 (6): e30295.
 25. Popov A., Buldini B., De Lorenzo P., Disaro S., Verzhbitskaya T., Movchan L., et al. Prognostic value of minimal residual disease measured by flow-cytometry in two cohorts of infants with acute lymphoblastic leukemia treated according to either MLL-Baby or Interfant protocols. *Leukemia* 2020; 34 (11): 3042–6.
 26. Popov A., Tsaur G., Verzhbitskaya T., Riger T., Permikin Z., Demina A., et al. Comparison of minimal residual disease measurement by multi-colour flow cytometry and PCR for fusion gene transcripts in infants with acute lymphoblastic leukaemia with *KMT2A* gene rearrangements. *Br J Haematol* 2023; 201 (3): 510–9.
 27. Popov A., Tsaur G., Permikin Z., Henze G., Verzhbitskaya T., Plekhanova O., et al. Genetic characteristics and treatment outcome in infants with *KMT2A* germline B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results of MLL-Baby protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2023; 70 (4): e30204.
 28. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L., Razzouk B.I., Ribeiro R.C., Rivera G.K., et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100 (7): 2399–402.
 29. 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* 2016; 9 (3): 302–13.
 30. Lucio P., Parreira A., van den Beemd M.W., 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.
 31. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шорилов Е.В., Савельев Л.И., Фечина Л.Г. Аберрации иммунофенотипа, применимые для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Иммунология* 2010; 31 (6): 299–303.
 32. 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.
 33. Bouriche L., Bernot D., Nivaggioni V., Arnoux I., Loosveld M. Detection of Minimal Residual Disease in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Using an Eight-Color Tube with Dried Antibody Reagents. *Cytometry B Clin Cytom* 2019; 96 (2): 158–63.
 34. Михайлова Е.В., Илларионова О.И., Масчан М.А., Новичкова Г.А., Карачунский А.И., Попов А.М. Рекомендации по определению минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при остром В-лимфобластном лейкозе в условиях применения CD19-направленной терапии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2023; 22 (2): 175–84. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-2-175-184
 35. 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.
 36. Gaipa G., Basso G., Aliprandi S., Migliavacca M., Vallinoto C., Maglia O., et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74 (3): 150–5.
 37. Dworzak M.N., Gaipa G., Schumich A., Maglia O., Ratei R., Veltroni M., et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78 (3): 147–53.
 38. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шорилов Е.В., Савельев Л.И., Фечина Л.Г. Изменения иммунофенотипа опухолевых бластов при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе у детей к 15-му дню индукционной терапии по протоколу ALL-MB-2008. *Иммунология* 2010; 31 (2): 60–4.
 39. Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Stow P., Zhou Y., Pui C.H., Rivera G.K., et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006; 108 (1): 97–102.
 40. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D., Mann G., Potschger U., Muhlegger 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.
 41. Михайлова Е.В., Вержбицкая Т.Ю., Румянцева Ю.В., Илларионова О.И., Семченкова А.А., Фечина Л.Г. и др. Влияние режима приема дексаметазона на выявление нормальных В-клеточных предшественников в костном мозге у детей с острым лимфобластным лейкозом на момент окончания индукционной терапии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (1): 53–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-53-57

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 необ-

щепринятых 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