

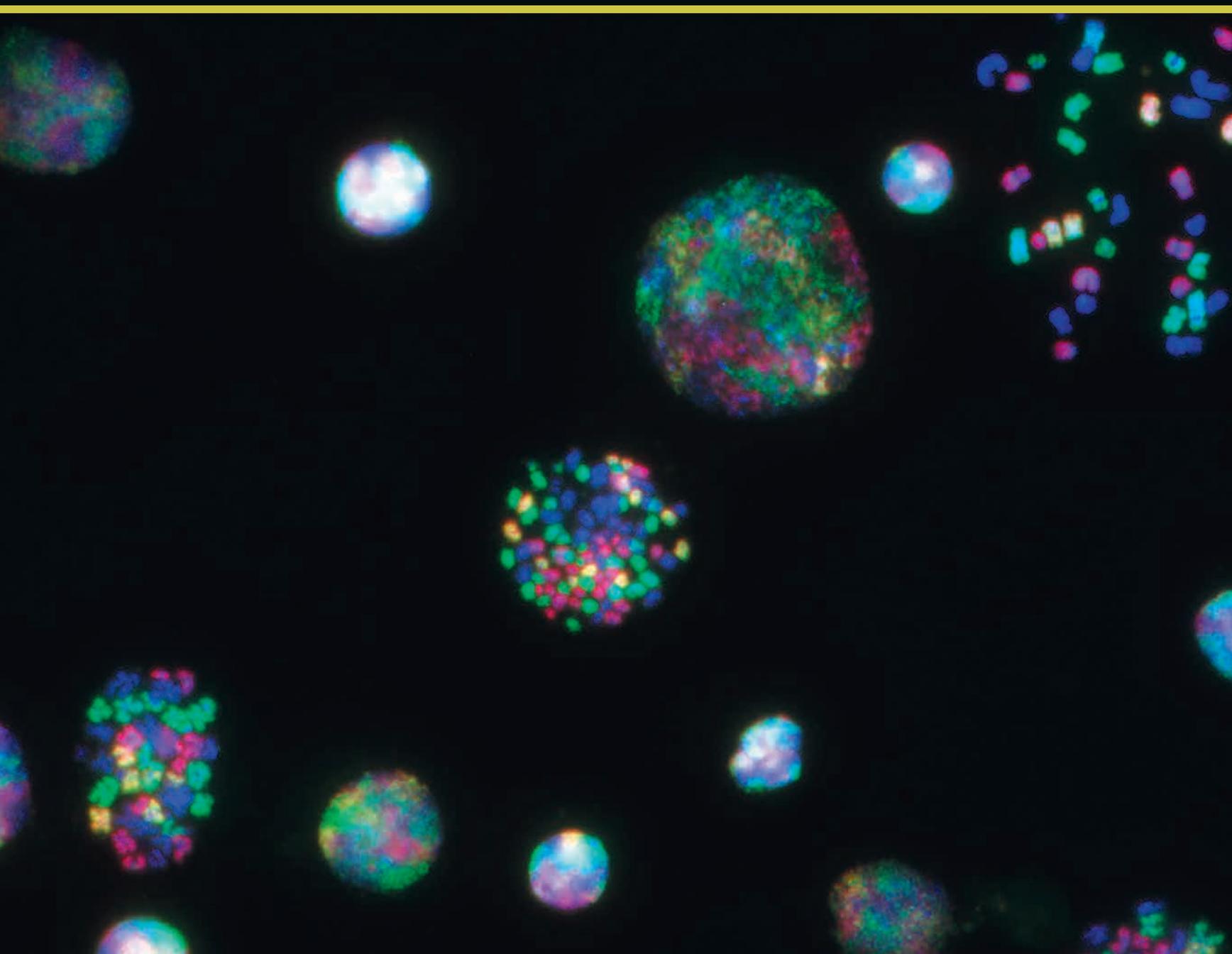
ISSN (Print) 0234-5730  
ISSN (Online) 2411-3042

ФГБУ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ГЕМАТОЛОГИИ

# ГЕМАТОЛОГИЯ И ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ

63.2. 2018

RUSSIAN JOURNAL  
OF HEMATOLOGY AND  
TRANSFUSIOLOGY





## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**главный редактор журнала**  
**заместитель главного редактора**  
**ответственный секретарь**

академик РАН, д. м. н., профессор **Савченко В. Г.**  
д. м. н. **Галстян Г. М.**  
к. м. н. **Троицкая В. В.**

**члены редколлегии**

**Афанасьев Б. В.** д. м. н., профессор. ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург  
**Буланов А. Ю.** д. м. н. ГКБ №52, Москва  
**Гапонова Т. В.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Гудков А. В.** д. б. н. Институт рака Розалла Парка, Буффало, США  
**Звонков Е. Е.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Зозуля Н. И.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Клясова Г. А.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Ковригина А. М.** д. б. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Крыжановский О. И.** к. м. н. Медицинский центр Алты Бейтс, Сан-Франциско, США  
**Купряшов А. А.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ ССХ им. А. Н. Бакулева, Москва  
**Масчан А. А.** чл.-кор. РАН, д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва  
**Менделеева Л. П.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Никитин Е. А.** д. м. н. ГКБ им. С. П. Боткина, Москва  
**Паровичникова Е. Н.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Семочкин С. В.** д. м. н. РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва  
**Судариков А. Б.** д. б. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Трахтман П. Е.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва  
**Тумян Г. С.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва  
**Чернов В. М.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

**Алейникова О. В.** чл.-кор. НАН Беларуси, д. м. н., профессор. РНПЦ онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь  
**Аль-Ради Л. С.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Байков В. В.** д. м. н. ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург  
**Бигильдеев А. В.** д. б. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Бидерман Б. В.** к. м. н. ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург  
**Бондаренко С. Н.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Васильев С. А.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Гаврилина О. А.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Гармаева Т. Ц.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Головкина Л. Л.** д. м. н. ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Санкт-Петербург  
**Грицаев С. В.** д. м. н., профессор. Гематологический центр им. Р. О. Еоляна, Ереван, Армения  
**Дабгашян С. С.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Двирных В. Н.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Джулакян У. Л.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Дроков М. Ю.** к. б. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Дубинкин И. В.** д. б. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Ефимов Г. А.** к. м. н. НИИ гематологии и переливания крови, Ташкент, Узбекистан  
**Исхаков Э. Д.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Кохно А. В.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Кузьмина Л. А.** д. м. н. ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург  
**Кулагин А. Д.** к. ф.-м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Куликов С. М.** д. м. н., профессор. РМАПО, Москва  
**Луговская С. А.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Лукина Е. А.** д. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Магомедова А. У.** профессор онкологии и внутренней медицины. Институт рака Розалла Парка, Буффало, США  
**Маккарти Ф.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва  
**Масчан М. А.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Михайлова Е. А.** профессор. Университетский госпиталь, Лейпциг, Германия  
**Моисеева Т. Н.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Нидервизер Д.** д. м. н. Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва  
**Обухова Т. Н.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва  
**Салимов Э. Л.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Сметанина Н. С.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Туполева Т. А.** д. м. н., профессор. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Туркина А. Г.** к. м. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Фидарова Э. Т.** Римский университет «La Sapienza», Рим, Италия  
**Фоа Р.** д. б. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Хамаганова Е. Г.** преподаватель клинической медицины. Больница Лоренс Мемориал, Нью-Йорк, США  
**Хелльман Р.** профессор медицины и гематологии. Франкфуртский университет, Франкфурт-на-Майне, Германия  
**Хольцер Д.** д. м. н. Областная детская клиническая больница, Екатеринбург  
**Цаур Г. А.** к. б. н. ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва  
**Шипунова И. Н.**

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ЖУРНАЛ**

Журнал представлен в международной базе данных РИНЦ (Российский индекс научного цитирования)

Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ журнал «Гематология и трансфузиология / Russian Journal of Hematology and Transfusiology» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

**АДРЕС РЕДАКЦИИ:**

125167, Москва,  
Новый Зыковский проезд, д. 4  
ФГБУ НМИЦ гематологии МЗ РФ  
Телефон: +7(495) 921-22-04  
E-mail: ht@htjournal.ru

Научный редактор Галстян Г. М.  
Редактор Первухова Н. В.  
Выпускающий редактор Ананич С. В.  
Корректор Алексеев В. А.  
Верстка Косовская Ю. Г.

Дизайн Чулкова И. Г.

Формат 230x297 мм  
Тираж 1500 экз.

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре РФ.  
Свидетельство о регистрации  
ПИ № ФС77-72666 от 16 апреля 2018 года

Отпечатано в ОАО «Можайский полиграфический комбинат»  
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93  
Объединенный каталог  
«Пресса России»: Индекс 41284

Подписка через интернет: [www.ppressa-rl.ru](http://www.ppressa-rl.ru)  
Подписка на электронную версию журнала: [elibrary.ru](http://elibrary.ru)  
ISSN 0234-5730 (Print)  
ISSN 2411-3042 (Online)  
Гематология и трансфузиология  
Russian Journal of Hematology and Transfusiology  
2018. Т. 63. № 2, 97-192

© ФГБУ НМИЦ гематологии  
МЗ РФ, Москва

Перепечатка материалов и использование их в любой форме, в том числе в электронных СМИ, возможны только с письменного разрешения редакции

## EDITORIAL BOARD

**EDITOR-IN-CHIEF** Academician, Dr. Sci. (Med.), Professor **Savchenko V. G.**  
**DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF** Dr. Sci. (Med.) **Galstyan G. M.**  
**EXECUTIVE SECRETARY** Cand. Sci. (Med.) **Troitskaya V. V.**

### SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED MEDICAL JOURNAL

The journal is presented in the international  
database of RSCI (Russian science citation  
index)

Under the decision of the Higher  
Attestation Commission (HAC)  
of the Ministry of Education and Science,  
Russian Journal of Hematology  
and Transfusiology is included in the list  
of leading peer-reviewed scientific  
journals, where the main scientific results  
of dissertations for academic degree  
of Candidate of Sciences and for academic  
degree of Doctor of Sciences should be  
published.

### ADDRESS OF EDITORIAL

125167, Moscow,  
Novyy Zykovskiy proezd, 4  
National Research Center  
for Hematology, Moscow  
Phone: +7(495) 921-22-04  
E-mail: ht@htjournal.ru

Science editor Galstyan G. M.  
Editor Pervuhova N. V.  
Production editor Ananich S. V.  
Corrector Alexeev V. A.  
Layout of Kosovskaya U. G.

Design by Chulkova I. G.

Format 230x297mm  
Printed copies 1500

The journal is registered in Roskomnadzor  
of the Russian Federation  
Registrations certificate PI No. FS77-72666  
dated April 16, 2018

Printed in JSC  
«Mozhaisk printing plant»  
143200, Mozhaisk, ul. Mira, 93  
United Catalog «Press of Russia»: Index 41284

Subscription via the Internet:  
www.pressa-rt.ru  
Subscription to the electronic  
version of the journal: elibrary.ru  
ISSN 0234-5730 (Print)  
ISSN 2411-3042 (Online)  
Russian Journal of Hematology  
and Transfusiology  
2018. Vol. 63. No. 2, 97-192.

© National Research Center  
for Hematology, Moscow

Reprinting of materials and their use in  
any form, including electronic media,  
is possible only with the written permission  
from the publisher

### EDITORIAL BOARD

**Afanasyev B. V.** Dr. Sci. (Med.), professor. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg  
**Bulanov A. Yu.** Dr. Sci. (Med.) City municipal hospital 52, Moscow  
**Gaponova T. V.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Gudkov A. V.** Dr. Sci. (Biol.) Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA  
**Zvonkov E. E.** Dr. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Zozulya N. I.** Dr. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Klyasova G. A.** Dr. Sci. (Med.), professor. National Research Center for Hematology, Moscow  
**Kovrigina A. M.** Dr. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Kryzhanovsky O. I.** Cand. Sci. (Med.) Alta Bates Summit Medical Center, San Francisco, USA  
**Kupryashov A. A.** Dr. Sci. (Med.) A. N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Moscow  
**Maschan A. A.** Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), professor. Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow  
**Mendeleeva L. P.** Dr. Sci. (Med.), professor. National Research Center for Hematology, Moscow  
**Nikitin E. A.** Dr. Sci. (Med.) S. P. Botkin City Hospital, Moscow  
**Parovichnikova E. N.** Dr. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Semochkin S. V.** Dr. Sci. (Med.) Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow  
**Sudarikov A. B.** Dr. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Trachtman P. E.** Dr. Sci. (Med.) Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow  
**Tumyan G. S.** Dr. Sci. (Med.), professor. N. N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Moscow  
**Chernov V. M.** Dr. Sci. (Med.), professor. Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

### EDITORIAL COUNCIL

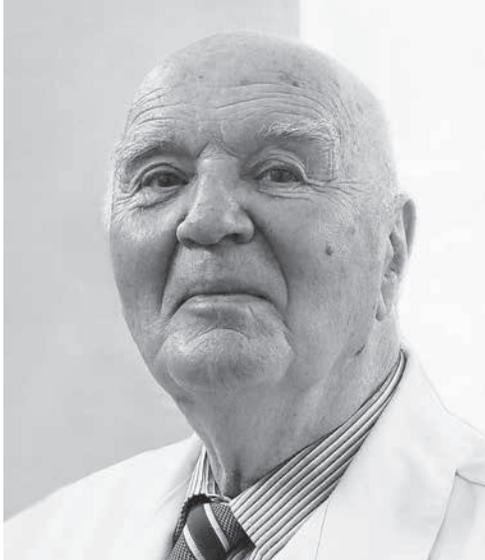
**Aleinikova O. V.** Corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, Dr. Sci. (Med.), professor.  
Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus  
**Al-Radi L. S.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Baykov V. V.** Dr. Sci. (Med.) Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg  
**Bigildeev A. V.** Dr. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Biderman B. V.** Cand. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Bondarenko S. N.** Cand. Sci. (Med.) Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg  
**Vasilyev S. A.** Dr. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Gavrilina O. A.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Garmaeva T. Ts.** Dr. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Golovkina L. L.** Dr. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Gritsaev S. V.** Dr. Sci. (Med.) Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of St Petersburg, Saint Petersburg  
**Dagbashyan S. S.** Dr. Sci. (Med.), professor. Hematology Center after R. H. Yalyan, Yerevan, Armenia  
**Dvirnyk V. N.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Julhakan H. L.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Drokov M. Yu.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Dubinkin I. V.** Cand. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Efimov G. A.** Dr. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Iskhakov E. D.** Cand. Sci. (Med.) Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Tashkent, Republic of Uzbekistan  
**Kokhno A. V.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Kuzmina L. A.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Kulagin A. D.** Dr. Sci. (Med.) Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg  
**Kulikov S. M.** Cand. Sci. (Phys.-Math) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Lugovskaya S. A.** Dr. Sci. (Med.), professor. Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow  
**Lukina E. A.** Dr. Sci. (Med.), professor. National Research Center for Hematology, Moscow  
**Magomedova A. U.** Dr. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**McCarthy Ph.** Professor of Oncology and Internal Medicine. Roswell Park Comprehensive Cancer Center  
**Maschan M. A.** Dr. Sci. (Med.), professor. Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow  
**Mikhailova E. A.** Dr. Sci. (Med.), professor. National Research Center for Hematology, Moscow  
**Moiseeva T. N.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Niederwieser D.** Professor of Medicine. University Hospital, Leipzig, Germany  
**Obukhova T. N.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Salimov E. I.** Dr. Sci. (Med.) I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow  
**Smetanina N. S.** Dr. Sci. (Med.), professor. Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow  
**Tupoleva T. A.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Turkina A. G.** Dr. Sci. (Med.), professor. National Research Center for Hematology, Moscow  
**Fidarova Z. T.** Cand. Sci. (Med.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Foa R.** Professor of Hematology. "Sapienza" University of Rome, Italy  
**Khamaganova E. G.** Dr. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow  
**Hellman R.** MD, Ass. Prof. Lawrence and Memorial Hospital, New London, USA  
**Hoelzer D.** Professor of Medicine and Hematology, MD, PhD. University of Frankfurt, Frankfurt, Germany  
**Tsaur G.** Dr. Sci. (Med.) Regional children's clinical hospital, Yekaterinburg  
**Shipunova I. N.** Cand. Sci. (Biol.) National Research Center for Hematology, Moscow

## СОДЕРЖАНИЕ

- 100-102 К 90-летию Андрея Ивановича Воробьева  
*Оригинальные статьи*
- 103-112 Соловьев М. В., Менделеева Л. П., Яцык Г. А., Луцик Н. С., Фирсова М. В., Гемдзян Э. Г., Савченко В. Г.  
**Мониторинг поражения костного мозга у больных множественной миеломой после трансплантации аутологичных стволовых клеток с помощью магнитно-резонансной томографии**
- 113-123 Костина И. Э., Гитис М. К., Менделеева Л. П., Баграмян А. Ю., Соловьев М. В., Грибанова Е. О., Савченко В. Г.  
**Рентгеновская компьютерная томография в диагностике и мониторинге поражения костей при множественной миеломе с использованием низкодозового и стандартного протоколов сканирования**
- 124-133 Чернова Н. Г., Сидорова Ю. В., Захарько Е. И., Наумова Е. В., Рыжикова Н. В., Гальцева И. В., Двирный В. Н., Смирнова С. Ю., Судариков А. Б., Кохно А. В., Моисеева Т. Н., Луговская С. А., Звонков Е. Е., Савченко В. Г.  
**Проточная цитометрия и ПЦР-исследование Т-клеточной клональности в разграничении опухолевой и реактивной пролиферации больших гранулярных лимфоцитов**
- 134-143 Адилгереева Э. П., Лавров А. В., Смирнихина С. А., Чельшева Е. Ю., Шухов О. А., Цаур Г. А., Кочергин-Никитский К. С., Якушина В. Д., Морданов С. В., Туркина А. Г., Куцев С. И.  
**Поиск новых маркеров эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ при хроническом миелоидном лейкозе методом полноэкзомного секвенирования**
- 144-158 Галстян Г. М., Спириин М. В., Зозуля Н. И., Полянская Т. Ю., Зоренко В. Ю.  
**Обеспечение долгосрочного сосудистого доступа у больных гемофилией**
- 159-165 Дахлави Х. А., Заини Р. Г., Замзами О. М., Альхумьяни А. Ф.  
**Гемоглобинопатии среди взрослых жителей Саудовской Аравии в городе Таиф**  
*Обзоры литературы*
- 166-173 Туполева Т. А.  
**Латентная форма инфекции, вызванная вирусом гепатита В**
- 174-183 Коробова А. Г., Клясова Г. А.  
**Энтеробактерии с продукцией β-лактамаз расширенного спектра: источники инфицирования и значение колонизации слизистой оболочки кишечника у больных гемобластозами**  
*Клинические наблюдения*
- 184-190 Бескоровайна Т. С., Аbrukова А. В., Миронович О. Л., Блинец Е. А., Миловидова Т. Б., Щагина О. А., Саваскина Е. Н., Поляков А. В.  
**Гемофилия А средней тяжести у девочки с несбалансированной лайонизацией хромосомы X**
- 191-199 Накастоев И. М., Авдонин П. П., Грибанова Е. О., Калинин Н. Н., Цветаева Н. В., Петрова В. И., Калинина И. И., Канаева М. Л., Журавлев В. В., Бирюкова Л. С., Авдонин П. В., Рыжко В. В.  
**Врожденная форма тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Краткий обзор и описание клинического случая**

## CONTENTS

- To the 90th anniversary of Andrei Ivanovich Vorobiev  
*Original articles*
- Solovyev M. V., Mendeleeva L. P., Yatsyk G. A., Lutsik N. S., Firsova M. V., Gemdzhian E. G., Savchenko V. G.  
**Monitoring bone marrow lesions by magnetic resonance imaging in patients with multiple myeloma after autologous stem-cell transplantation**
- Kostina I. E., Gitis M. K., Mendeleeva L. P., Bagramyan A. Yu., Solovyev M. V., Gribanova E. O., Savchenko V. G.  
**Computed tomography in the diagnosis and monitoring of bone lesions in multiple myeloma using low-dose and standard scanning protocols**
- Chernova N. G., Sidorova Yu. V., Zakharko E. I., Naumova E. V., Ryzhikova N. V., Galtseva I. V., Dvirnyk V. N., Smirnova S. Yu., Sudarikov A. B., Kokhno A. V., Moiseeva T. N., Lugovskaya S. A., Zvonkov E. E., Savchenko V. G.  
**Flow cytometry and PCR-based T-cell clonality testing for discriminating between reactive and neoplastic proliferation of large granular lymphocytes**
- Adilgereeva E. P., Lavrov A. V., Smirnikhina S. A., Chelysheva E. Y., Shukhov O. A., Tsauro G. A., Kochergin-Nikitsky K. S., Yakushina V. D., Mordanov S. V., Turkina A. G., Kutsev S. I.  
**Search of new prognostic markers of efficacy of therapy with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients using exome sequencing**
- Galstyan G. M., Spirin M. V., Zozulya N. I., Polyanskaya T. Yu., Zorenko V. Yu.  
**Providing of the long-term vascular access in hemophilia patients**
- Dahlawi H. A., Zaini R. G., Zamzami O. M., Alhomyani A. F.  
**Hemoglobinopathies among Saudi adults at Taif city, Saudi Arabia**  
*Review articles*
- Tupoleva T. A.  
**Occult form of infection caused by the hepatitis B virus**
- Korobova A. G., Klyasova G. A.  
**Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: sources of infection and the importance of intestinal colonization in patients with hematological malignancies**  
*Case reports*
- Beskorovainaya T. S., Abrukova A. V., Mironovich O. L., Bliznets E. A., Milovidova T. B., Shchagina O. A., Savaskina E. N., Polyakov A. V.  
**Skewed X-chromosome inactivation in heterozygous female with moderate hemophilia A**
- Nakastoev I. M., Avdonin P. P., Gribanova E. O., Kalinin N. N., Tsvetaeva N. V., Petrova V. I., Kalinina I. I., Kanaeva M. L., Zhuravlev V. V., Biryukova L. S., Avdonin P. V., Ryzhko V. V.  
**Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. Case report and review.**



*От редакции*

## К 90-ЛЕТИЮ АНДРЕЯ ИВАНОВИЧА ВОРОБЬЕВА

**1 ноября 2018 года исполняется 90 лет врачу с большой буквы, выдающемуся ученому, талантливому организатору здравоохранения Андрею Ивановичу Воробьеву, являвшемуся на протяжении долгих лет главным редактором нашего журнала.**

Андрей Иванович родился 1 ноября 1928 г. в Москве в семье революционеров-большевиков: врача Ивана Ивановича Воробьева (расстрелянного 20 декабря 1936 года) и ученого-биолога Миры (Марии) Самуиловны Воробьевой (урожденной Кизильштейн; в 1937 году она была осуждена на 10 лет исправительно-трудовых лагерей). Андрей Воробьев — сын «врагов народа» — попал в детский дом, откуда его спасли родственники.

- С 1943 по 1944 год работал маляром.
- В 1947 г. окончил школу с золотой медалью.
- С 1947 по 1953 год учился в Первом Московском медицинском институте.
- С 1953 по 1956 год работал в Волоколамской районной больнице участковым терапевтом, патологоанатомом, заведовал поликлиникой, отвечал за районную педиатрию и детскую комнату родильного дома.
- В 1956 году поступил в клиническую ординатуру к профессору Иосифу Абрамовичу Кассирскому на кафедру гематологии Центрального института усовершенствования врачей (в настоящее время РМАНПО). В 1971 г. Андрей Иванович был избран заведующим кафедрой гематологии и трансфузиологии этого института, которую возглавляет до настоящего времени.
- В 1966—1974 гг. руководил клиническим отделом Института биофизики МЗ СССР. В 1968 г. защитил докторскую диссертацию «Опухолевая прогрессия и некоторые вопросы патогенеза лейкозов».
- В 1986 году — инициатор создания и член правительственной медицинской комиссии по аварии на Чернобыльской атомной электростанции.
- В 1986 году избран членом Академии медицинских наук СССР.
- С 1987 по 2011 год — директор Гематологического научного центра Академии медицинских наук (ГНЦ РАМН) (в настоящее время — ФГБУ «НМИЦ гематологии» Министерства здравоохранения России).
- С 1987 по 2018 год — главный редактор журнала «Гематология и трансфузиология».
- В 1990—1991 гг. — народный депутат СССР.
- С 1991 по 1992 год — министр здравоохранения Российской Федерации.
- В 2000 году избран академиком РАН по Отделению биологических наук.

Школа Андрея Ивановича Воробьева — это десятки настоящих ученых, учеников, это сотни новых открытий и многие тысячи спасенных жизней.

Научный коллектив под руководством Андрея Ивановича внес принципиальный вклад в развитие современной гематологии, как в клиническом плане, так и в фундаментальном и экспериментальном отношениях.

В 1964 г. А. И. Воробьев выдвинул оригинальную теорию опухолевой прогрессии лейкозов, которая опирается на явление повышенной мутабельности опухолевых клеток, появление субклонов в ранне моноклональной опухоли. Вместо бытовавшего ранее описательного подхода к опухолевому росту были выявлены универсальные закономерности развития злокачественных опухолей с учетом морфологических, функциональных, цитогенетических и клинических признаков опухолевого роста.

Работы по культивированию костного мозга позволили А. И. Воробьеву (совместно с И. Л. Чертковым) предложить в 1973 г. принципиально новую схему кроветворения и наметить в ней клеточные уровни возникновения опухолей. Обнаружение «резервных популяций», анализ возрастных и морфологических характеристик гемобластозов привели А. И. Воробьева к созданию «теории смены клеточных пластов», согласно которой в ходе постнатального развития организма происходит смена функционально-родственных родоначальных клеточных элементов, что, в частности, объясняет принципиальное отличие опухолей одного возрастного периода от морфологически сходных опухолей другого возрастного периода.

В начале 1960-х гг., изучая кинетику распада эритроцитов, А. И. Воробьев открыл наличие «резервной» популяции эритроцитов, увеличивающейся в ответ на резкое возрастание потребности организма в кислороде. Это открытие легло в основу методов диагностики гемолитических анемий.

Вместе с Таисией Владимировной Шишковой А. И. Воробьев описал дисгормональную кардиопатию — особую форму поражения сердца, расценивавшуюся ранее как инфаркт миокарда.

В 1972 г. Андрей Иванович Воробьев вместе с Мариной Давыдовной Бриллиант первыми в нашей стране применили «тотальную программную химиотерапию» и впервые вылечили детей от острого лимфобластного лейкоза. Они же первыми создали программу профилактики нейрорлейкемии с помощью интратекального введения цитостатических препаратов.

Одним из направлений работы школы А. И. Воробьева явилось изучение радиационной патологии. Им было дано классическое описание патогенеза лучевой болезни, создана единственная в мире комплексная система биологической дозиметрии, включающая анализ кинетики клеточных популяций, анализ хромосомных перестроек и морфологических изменений тканей. Это привело к разработке теоретических основ патогенетической интенсивной терапии в лучевой патологии, гематологии и при других состояниях, характеризующихся массивным распадом тканей. Незаменимость такой терапии в условиях массовых радиационных поражений была особенно наглядно подтверждена при ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС в 1986 г. Применение ее в условиях массового радиационного поражения позволило провести точную диагностику и сортировку пострадавших, обеспечив тем самым раннюю и адекватную терапию. Работы по изучению последствий чернобыльской катастрофы доказали пороговость онкогенного воздействия радиации малой мощности.

Наблюдая течение заболевания у пациентов, подвергшихся аварийному облучению, сравнивая эффекты радиации с действием противоопухолевых препаратов, А. И. Воробьев сформулировал понятие «цитостатическая болезнь».

В работах А. И. Воробьева и его школы разработана уточненная классификация опухолей лимфатической системы, учитывающая их органоспецифичность, морфологию и чувствительность к цитостатическим препаратам. Основанные на ней программы терапии позволили достигнуть выдающихся успехов в лечении ряда лимфатических опухолей.

А. И. Воробьев развил в Гематологическом научном центре РАМН (до 1987 г. — Центральный институт переливания крови МЗ СССР) ряд новых научных направлений и значительно расширил его клинику, в которой сегодня на высшем уровне, вклю-

чая терапию критических состояний, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток крови и трансплантацию почки, осуществляется лечение широчайшего круга гематологических заболеваний.

Под руководством Андрея Ивановича сотрудники ГНЦ РАМН принимали участие в оказании помощи пострадавшим практически во всех техногенных и природных катастрофах последних десятилетий (армянское землетрясение 1988 г., сахалинское землетрясение 1994 г., чернобыльская авария, взрывы на железной дороге, захват заложников в Беслане). А. И. Воробьев разработал современные методы лечения ДВС и краш-синдрома, сформулировал принципы оказания медицинской помощи в условиях катастроф.

Работа Андрея Ивановича неразрывно связана с преподаванием не только гематологии, но и кардиологии, трансфузиологии, морфологии, дифференциальной диагностики и интенсивной терапии критических состояний.

Его блестящие лекции по проблеме внутренней медицины, утренние конференции, на которых, отталкиваясь от конкретных клинических ситуаций, обсуждались самые острые вопросы диагностики и лечения, широко известны не только в Москве, но и далеко за ее пределами. Проводимые под его руководством, начиная с 1972 г., ежегодные декадни памяти И. А. Кассирского «Новое в гематологии и трансфузиологии» стали в то время практически неформальными съездами гематологов всей страны, а также стран СНГ.

Важнейшими чертами врача А. И. Воробьев считает сосредоточенность на пациенте, способность выделить главное и действовать немедленно, а главным недостатком — упрямство. Он всегда готов признать свою ошибку и решительно перестраивает диагноз и стратегию, если появляются новые факты или новое понимание.

Андрей Иванович Воробьев, будучи первым министром здравоохранения Российской Федерации в 1991—1992 гг., приложил максимум усилий для сохранения и развития здравоохранения после развала СССР. На этом посту он боролся за сохранение лучших черт отечественной системы здравоохранения. Ему принадлежит инициатива Указа Президента (сентябрь 1992 г.) о финансировании дорогостоящих видов лечения, который спас медицину от деградации и до сего дня поддерживает существование бесплатных для населения, высококвалифицированных медицинских услуг.

Все в своей огромной трудовой биографии Андрей Иванович всегда выполнял с энтузиазмом и с огромным успехом. Он награжден орденами Ленина, «За заслуги перед Отечеством» III степени, является лауреатом Государственной премии СССР, заслуженным деятелем науки Российской Федерации.

И сейчас академик А. И. Воробьев является президентом регионального благотворительного общественного фонда «Гематология и интенсивная терапия», его работа — надежда для многих людей, страдающих тяжелыми нарушениями системы крови, которые говорят огромное спасибо Андрею Ивановичу Воробьеву.

Глубокоуважаемый Андрей Иванович, дальнейших творческих Вам успехов, здоровья и долгих лет жизни!

Редколлегия журнала  
«Гематология и трансфузиология»,  
ученики и коллеги

# МОНИТОРИНГ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ ПОСЛЕ ТРАСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ

Monitoring bone marrow lesions by magnetic resonance imaging in patients with multiple myeloma after autologous stem-cell transplantation

Соловьев М. В., Менделеева Л. П., Яцык Г. А., Луцик Н. С.,  
Фирсова М. В., Гемджян Э. Г., Савченко В. Г.

ФГБУ «Национальный медицинский центр гематологии»  
Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Solovyev M. V., Mendeleeva L. P., Yatsyk G. A., Lutsik N. S.,  
Firsova M. V., Gemdzian E. G., Savchenko V. G.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian  
Federation

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Несмотря на результаты исследований, оценивающих роль магнитно-резонансной томографии (МРТ) в диагностике множественной миеломы (ММ), имеются лишь ограниченные данные, характеризующие ценность МРТ после завершения противоопухолевого лечения, в особенности после трансплантации аутологичных стволовых клеток (ауто-ТГСК).

**Цель.** Изучить изменение поражений костного мозга по данным МРТ у больных ММ до и после ауто-ТГСК.

**Материалы и методы.** Сорок больных ММ (15 мужчин и 25 женщин) в возрасте от 36 до 66 лет (медиана 56 лет) были включены в проспективное исследование по оценке поражений костного мозга методом МРТ до и после высокодозной химиотерапии с последующей ауто-ТГСК. Исследование костного мозга проводили на МРТ-томографе GE Signa Profile без контрастного усиления. Определяли характер и проводили подсчет поражений костного мозга ( $\geq 5$  мм).

**Результаты.** При анализе МР-томограмм уменьшение количества очагов после ауто-ТГСК выявлено у 17 (52%) больных, а уменьшение объема опухолевой массы — у 29 (88%) больных. У большинства больных даже при достижении значимого противоопухолевого ответа — полной ремиссии (ПР) методом МРТ выявлялось остаточное опухолевое поражение костного мозга, которое уменьшалось после выполнения ауто-ТГСК — количество выявляемых очагов в 1,4 раза, а объем опухоли в 2,4 раза.

## ABSTRACT

**Introduction.** Despite the availability of results from several studies that evaluated the role of magnetic resonance imaging (MRI) in the diagnosis of multiple myeloma (MM), data on the value of MRI after antineoplastic treatment, in particular after autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT), are limited.

**Objective.** To study changes in bone marrow lesions using MRI in MM patients before and after auto-HSCT.

**Materials and methods.** Forty patients with MM (15 male and 25 female) aged 36 to 66 years (median age 56 years) were enrolled in a prospective study. MRI of the spine and pelvic bones was performed before and 100 days after auto-HSCT to track bone marrow changes after transplantation. MRI was carried out with a GE Signa Profile system without contrast enhancement. The nature of the lesions was determined, and the bone marrow infiltration lesions ( $\geq 5$  mm) were counted.

**Results.** MR images showed a decrease in the number of foci after auto-HSCT in 17 (52%) patients, and a reduction in the volume of the tumors in 29 (88%) patients. In most patients, even when a complete response (CR) was achieved, MRI revealed residual tumor load in the bone marrow, which decreased after auto-HSCT (by 1.4 times in the number of detectable lesions, and by 2.4 times in the tumor volume).

**Conclusion.** By making it possible to evaluate the residual tumor load, whole-body bone marrow MRI can be used as

**Заключение.** МРТ костного мозга является дополнительным неинвазивным методом оценки ответа на противоопухолевую терапию у больных ММ, поскольку позволяет выявить наличие остаточного опухолевого субстрата при исследовании всего скелета.

**Ключевые слова:** множественная миелома, магнитно-резонансная томография, трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

**Для цитирования:** Соловьев М. В., Менделеева Л. П., Яцык Г. А., Луцки Н. С., Фирсова М. В., Гемдзян Э. Г., Савченко В. Г. Мониторинг поражения костного мозга у больных множественной миеломой после трансплантации аутологичных стволовых клеток с помощью магнитно-резонансной томографии. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):103–112

doi: 10.25837/HAT.2018.67..2..001

**Для корреспонденции:** Соловьев Максим Валерьевич, врач-гематолог, аспирант научно-клинического отделения высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Электронная почта: maxsolovej@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.04.2018

Принята к печати 16.05.2018

an additional non-invasive method for assessing response to antitumor therapy in MM patients.

**Key words:** multiple myeloma, magnetic resonance imaging, transplantation of autologous hematopoietic stem cells

**For citation:** Solovyev M. V., Mendeleeva L. P., Yatsyk G. A., Lutsik N. S., Firsova M. V., Gemdzhian E. G., Savchenko V. G. Monitoring bone marrow lesions by magnetic resonance imaging in patients with multiple myeloma after autologous stem-cell transplantation. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):103–112 (in Russian)

doi: 10.25837/HAT.2018.67..2..001

**For correspondence:** Maksim V. Solovyev, M.D., postgraduate, Department of High-Dose Chemotherapy of Paraproteinemic Hemoblastosis, National Research Center for Hematology, Moscow  
E-mail: maxsolovej@mail.ru

**Information about authors:**

Solovyev M. V., <https://orcid.org/0000-0002-7944-6202>;  
Mendeleeva L. P., <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>;  
Yatsyk G. A., <https://orcid.org/0000-0001-5085-4045>;  
Lutsik N. S., <https://orcid.org/0000-0002-7556-2054>;  
Firsova M. V., <https://orcid.org/0000-0003-4142-171X>;  
Gemdzhian E. G., <http://orcid.org/0000-0002-8357-977x>;  
Savchenko V. G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 03 Apr 2018

Accepted 16 May 2018

## Введение

Множественная миелома (ММ) — вторая по распространенности гематологическая опухоль, характеризующаяся инфильтрацией костного мозга клональными плазматическими клетками и наличием гиперкальциемии, почечной недостаточности, анемии и поражения костей (критерии CRAB) [1–3].

Остеодеструктивный компонент как проявление симптоматической ММ формируется за счет порочного круга, обусловленного взаимодействием опухолевых клеток и микроокружения костного мозга. Основным механизмом поражения костной ткани реализуется в условиях неангиогенеза как следствие увеличения остеокластической резорбции кости и инактивации остеобластов [4, 5].

Включение различных сигнальных путей поражения костной ткани отражает агрессивное течение болезни, являясь фактором трансформации бессимптомной формы заболевания в симптоматическую ММ. Моноклональная гаммапатия неопределенного значения (МГНЗ) является классическим состоянием, предшествующим развитию симптоматической миеломы. Существует и промежуточная форма между МГНЗ и симптоматической ММ, определяемая как

«тлеющая» или «вялотекущая» ММ. Частота прогрессии МГНЗ в симптоматическую миелому составляет приблизительно 1% в год, тогда как «тлеющая» ММ имеет гораздо более высокую частоту прогрессии — 10% в год.

На протяжении многих лет диагноз ММ требовал доказательства повреждения органов-мишеней (критерии CRAB), но в 2014 г. Международная рабочая группа по изучению ММ (IMWG) обновила диагностические критерии миеломы, добавив три специфических маркера, которые могут быть использованы при диагностике у больных без симптомов CRAB. Среди них выделены следующие: обнаружение в костном мозге  $\geq 60\%$  клональных плазматических клеток; соотношение свободных легких цепей (СЛЦ) в сыворотке крови  $\geq 100$ , при условии, что уровень СЛЦ составляет 100 мг/л или выше; обнаружение более одного очага поражения костного мозга размером свыше 5 мм при магнитно-резонансной томографии (МРТ) костей скелета. Эти изменения указывают на высокий риск прогрессии заболевания и позволяют предупредить поражение органов-мишеней путем раннего начала специфической противоопухолевой терапии [6].

Включение в критерии диагностики симптоматической ММ данных МРТ основано на результатах исследования Hillengass et al., в котором была проведена оценка МР-томограмм всего тела 149 больных с диагнозом МГНЗ [7]. В рамках исследования проводился анализ характера поражений костного мозга и влияния данных МРТ на частоту и сроки прогрессии в симптоматическую ММ. У 23 больных при МРТ определялись множественные очаги поражения костного мозга размером свыше 5 мм, при этом двухлетняя выживаемость без прогрессии (ВБП) для этой группы больных составила 30 против 80% для больных, у которых определялось не более 1 очага поражения костного мозга ( $p < 0,001$ ) [7].

Включение результатов МРТ костного мозга в критерии диагностики ММ связано с развитием представлений о патогенезе разрушения костной ткани и биологических особенностях эволюции МГНЗ в симптоматическую ММ. Процесс разрушения костной ткани происходит во времени, а скорость ее повреждения связана с несколькими факторами, в числе которых — каскадная активация сигнальных путей, ответственных за различные механизмы разрушения кости. В зависимости от этапов разрушения костной ткани используются разные методы детекции поражений ее структуры. К ним относятся: стандартная рентгенография и компьютерная томография (КТ), низкодозовая компьютерная томография всего скелета, МРТ и позитронно-эмиссионная компьютерная томография (ПЭТ-КТ) [8].

Долгое время методы оценки поражений костей ограничивались классической рентгенографией [9–11], однако появление КТ позволило иначе взглянуть на выявление поражений костной ткани у больных ММ. КТ позволяет выявить мелкие очаги остеолитического характера, которые не видны на обычных рентгенограммах [12–13].

В отличие от рентгенологических методов детекции поражений костной ткани, МРТ позволяет визуализировать костный мозг и оценить степень его инфильтрации опухолевыми клетками еще до того, как на рентгенограммах станет видна костная деструкция [14].

Преимущества МРТ перед традиционной рентгенографией и КТ заключаются в следующем: отсутствие лучевой нагрузки, лучшая визуализация осевого скелета благодаря более высокой чувствительности метода, возможность выявления различий между опухолевым поражением и нормальным костным мозгом, выявление поражения мягких тканей при ММ. МРТ является обязательным методом исследования при подозрении на компрессию спинного мозга, поскольку позволяет точно оценить уровень и степень компрессии, размер опухолевой массы и степень инвазии в эпидуральное пространство [15].

Для оценки состояния костного мозга при гемобластозах используются несколько режимов МРТ. Наиболее информативными из них являются: изображения в Т1-режиме, Т2-режиме с подавлением сигнала от жировой ткани, режиме STIR (краткосрочное инверсионное

восстановление) и Т1-режиме с подавлением сигнала от жировой ткани и введением контрастного препарата — гадолиния. Типичные поражения костного мозга при ММ проявляются при МРТ сигналом слабой интенсивности на Т1-изображениях и сигналом высокой интенсивности на Т2- и STIR-изображениях [15].

Выделяют пять типов МРТ-изображений костного мозга при ММ [16, 17]:

1. Отсутствие изменений костного мозга — несмотря на обнаруживаемую при микроскопическом исследовании плазмноклеточную инфильтрацию, при МРТ специфическое поражение костного мозга не выявляется (у 30% больных ММ).

2. Очаговое поражение — локализованные очаги измененного сигнала при МРТ костного мозга, которые обнаруживаются примерно в 30% случаев.

3. Диффузная инфильтрация костного мозга злокачественными клетками — проявляется в виде диффузного, или «рассеянного», снижения интенсивности сигнала при МРТ на изображениях в режиме Т1 (у 25% больных ММ).

4. Комбинированная диффузная и очаговая инфильтрация обнаруживается примерно у 10% больных ММ. На изображениях в режиме Т1 интенсивность сигнала от костного мозга диффузно снижена, и в ней выявляются дополнительные очаги.

5. Картина по типу «соль и перец» с неомогенным костным мозгом и вкрапленными в него жировыми островками. Обнаруживается примерно у 3–5% больных. На изображениях в режиме Т1, а также с градиентом эхо и в режиме Т2 костный мозг выглядит неомогенным и пятнистым.

Очаговые и диффузные изменения при МРТ могут отражать и другой патологический или патофизиологический процесс, например гемосидероз, амилоидоз или реактивную гиперплазию костного мозга [18].

Низкой опухолевой нагрузке обычно сопутствует нормальная картина при МРТ, а высокую опухолевую массу можно заподозрить по диффузным гипоинтенсивным изменениям на изображениях в режиме Т1, диффузной гиперинтенсивности сигнала на изображениях в режиме Т2 и их усилению после введения контрастного препарата. У больных с нормальной картиной на МРТ или картиной по типу «соль и перец» опухолевая нагрузка ниже, чем у больных с картиной диффузного или очагового поражения [15].

Тип поражения костного мозга оказывает влияние на показатели выживаемости больных. В исследовании Moulouropoulos et al. [19] проведен анализ МР-томограмм костного мозга 142 больных ММ до начала противоопухолевой терапии. Очаговые поражения костного мозга были выявлены у 50% больных, диффузная инфильтрация — у 28%, комбинированное поражение — у 14%, нормальная картина костного мозга наблюдалась в 8% случаев. При сравнении данных МРТ с другими клиническими характеристиками заболевания была выяв-

лена связь диффузного поражения по данным МРТ со стадией заболевания по системе ISS, глубокой анемией, гиперкальциемией, повышенной активностью лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и выраженной инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками по данным микроскопического исследования.

Частота достижения противоопухолевого ответа у больных с разными типами поражения костного мозга по данным МРТ была одинаковой. Однако анализ выживаемости показал, что тип поражения костного мозга, по данным МРТ, оказывал достоверное влияние на общую выживаемость (ОВ). Медиана ОВ составила 24 месяца в группе больных с диффузной инфильтрацией, 51 месяц — при очаговых поражениях, 52 месяца — при комбинированных нарушениях и 56 месяцев в группе больных с нормальной картиной на МРТ ( $p = 0,001$ ) [19].

Elias et al. [20] также подтвердили взаимосвязь между диффузными поражениями костного мозга и III стадией заболевания по ISS, которая характеризуется высокой опухолевой нагрузкой ( $p = 0,015$ ). Двумстам шести больным ММ была выполнена МРТ всего тела перед началом специфической противоопухолевой терапии, включающей индукционный этап, трансплантацию аутологичных стволовых клеток крови (ауто-ТГСК) и поддерживающее лечение. Ауто-ТГСК была выполнена 160 больным, 46 больным трансплантация не выполнялась. Поддерживающая терапия проводилась у 83 больных и включала интерферон у 17 больных, талидомид у 47 больных и бортезомиб у 19 больных. Результаты исследования показали, что повышенный уровень креатинина ( $p = 0,003$ ), анемия ( $p < 0,001$ ) и высокая активность ЛДГ ( $p = 0,001$ ) коррелировали с диффузной инфильтрацией костного мозга по данным МРТ. Неблагоприятные цитогенетические изменения, такие как del17p, амплификация 1q21 и t(4;14), также ассоциировались с диффузной инфильтрацией костного мозга, выявляемой на МРТ ( $p = 0,008$ ) [20].

МРТ — высокочувствительный метод обнаружения инфильтрации костного мозга опухолевыми клетками на ранней стадии, еще до разрушения кости. Это подтверждено результатами исследований, в которых проводилось сравнение изображений, полученных при МРТ, и стандартных рентгенограмм.

В исследовании Walker et al. [21] с октября 1998 г. по февраль 2004 г. участвовали 668 больных симптоматической ММ в возрасте до 75 лет. В рамках исследования проводилась оценка исходных рентгенологических и МРТ-характеристик. МРТ-исследования были ограничены осевым скелетом, тогда как рентгенологическое исследование, проводимое с помощью цифровых рентгеновских аппаратов, включало в себя определение очагов поражения в костях грудной клетки в двух проекциях, ребрах, костях черепа и позвоночника, таза и конечностей. МРТ проводилась с помощью серии последовательностей, позволяющих идентифицировать очаговое или диффузное вовлечение костно-

го мозга, включая спиновое эхо (T1- и T2-взвешенное), градиентное эхо (T2), короткое восстановление инверсии T1 (STIR) и усиленные введением контрастного препарата (гадолиний) спиновые эхо-последовательности (с подавлением жира и без него).

Анализируемые данные включали локализацию, количество и размер очаговых поражений, связанных с ММ (исключая поражения, характерные для гемангиом и дегенеративных заболеваний). Также определялись локализация и количество компрессионных переломов тел позвонков, общие характеристики МР-сигнала от костного мозга при различных последовательностях изображения. При сравнении данных, полученных с помощью обоих методов, по крайней мере один очаг инфильтрации был обнаружен у 451 (74%) больного по данным МРТ и у 344 (56%) больных по данным стандартной рентгенографии. У 128 (21%) больных не было выявлено поражений костей ни при МРТ, ни при рентгенографии. У 139 (52%) из 267 больных без очагов остеодеструкций по данным рентгенографии были выявлены инфильтративные изменения костного мозга на МРТ. Среднее число очагов поражения для всех пациентов составило 9,9 по данным МРТ и 4,4 по данным рентгенографии. Кроме этого, очаги поражения, по сравнению с рентгенографией, достоверно чаще выявлялись в следующих анатомических областях: позвоночнике — 78 и 16% случаев соответственно ( $p < 0,001$ ); костях таза — 64 и 28% соответственно ( $p < 0,001$ ) и грудине — 24 и 3% соответственно ( $p < 0,001$ ). При этом МРТ имела более низкую диагностическую ценность в сравнении со стандартной рентгенографией при исследовании ребер — выявление очагов поражения в 10 и 43% случаев соответственно ( $p < 0,001$ ) и длинных костей конечностей — 37 и 48% соответственно ( $p = 0,006$ ).

Исследователи оценили влияние выявленных на МРТ изменений на ОВ. По совокупности двух факторов, включающих цитогенетические аномалии и количество очагов поражения по данным МРТ, в рамках исследования были выделены три группы больных. В первую группу были включены больные с нормальной картиной по МРТ и отсутствием цитогенетических аномалий ( $n = 276$ ), вторая группа включала 262 больных, у которых определялось менее семи очагов поражения костного мозга по данным МРТ и не выявлялись цитогенетические аномалии. Третью группу составили 67 больных с наличием цитогенетических аномалий и более семи очагов поражения костного мозга по данным МРТ. Пятилетняя ОВ равнялась 76% для первой группы, 61% для второй и 37% для третьей ( $p < 0,001$ ). Таким образом, данные МРТ, но не рентгенографии, достоверно ассоциировались с ОВ [21].

Изменение результатов МРТ костей скелета у больных ММ после лечения также изучалось в ряде исследований.

Первые сведения об изменении картины костного мозга при МРТ у больных ММ приведены в исследо-

вании Moulouropoulos et al. [22]. В анализ были включены 20 больных ММ, которым была выполнена МРТ-визуализация позвоночника до и после химиотерапии, Т1-взвешенные изображения были получены до и после введения контрастного вещества. Результаты исследования показали, что при достижении полной ремиссии (ПР) после химиотерапии МРТ-картина характеризовалась восстановлением и ремоделированием костного мозга. У больных с частичной ремиссией (ЧР) наблюдалась трансформация диффузного поражения в очаговое или комбинированное с уменьшением количества аномалий костного мозга. Таким образом, изменения, наблюдавшиеся при МРТ после лечения, коррелировали с клиническим ответом, как это определено стандартными критериями.

Несмотря на результаты исследований, оценивающих роль МРТ-изображений в диагностике ММ, имеются лишь ограниченные данные, характеризующие ценность МРТ после завершения противоопухолевого лечения, в особенности после ауто-ТГСК.

Целью нашего исследования было изучение изменения поражений костного мозга по данным МРТ у больных ММ до и после ауто-ТГСК.

## Материалы и методы

С декабря 2015 г. по март 2017 г. 40 больных ММ (15 мужчин и 25 женщин) в возрасте от 36 до 66 лет (медиана 56 лет) были включены в проспективное исследование по оценке поражений костного мозга посредством МРТ до и после выполнения высокодозной химиотерапии с последующей ауто-ТГСК.

Диагноз ММ устанавливали в соответствии с критериями, разработанными международной рабочей группой по изучению ММ (IMWG, 2014 г.) [6]. На момент постановки диагноза у 17 больных была стадия заболевания I по системе ISS [1], у 13 больных — стадия II и у 10 больных — стадия III. Миеломная нефропатия в дебюте заболевания была выявлена у 8 (20%) больных. Костные плазмцитомы определялись у 14 (35%) больных. Цитогенетическое исследование, выполненное 14 больным, выявило высокий цитогенетический риск у 6 больных и стандартный риск у 8 больных (IMWG, 2016) [23].

Всем больным проводилась индукционная терапия с включением бортезомиба, иммуномодулирующие препараты применялись в 7 случаях. Затем выполнялась мобилизация (по схеме циклофосфамид 4 г/м<sup>2</sup> + Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) или только Г-КСФ) и сбор CD34+ клеток крови с последующей однократной (31 больной) или двойной (9 больных) ауто-ТГСК в условиях высокодозной терапии мелфаланом (140–200 мг/м<sup>2</sup>). Перед первой ауто-ТГСК и через 100 дней после нее проводили МРТ позвоночника и костей таза по нижеописанному протоколу для сравнения изменений поражений костного мозга. Противоопухолевый ответ после завершения индукции и

на 100-й день после ауто-ТГСК оценивался в соответствии с критериями, разработанными IMWG (2014 г.).

*Протокол МРТ-сканирования.* Исследование костного мозга проводили на аппарате для МРТ GE Signa Profile с использованием катушек Body Flex Coil Medium или Body Flex II Coil Large без введения контрастного препарата. В протокол сканирования позвоночника были включены импульсные последовательности (ИП): T2FSE (TR = 2500, TE = 105, FOV = 25 × 25), T1SE (TR = 500, TE = 18, FOV = 25 × 25), Myelo (TR = 1545, TE = 1387, FOV = 35 × 35), T2STIR (TR = 5100, TE = 34,4, FOV = 32 × 32). Толщина среза 4,5 thk/1,0 sp; 5,0 мм.

Исследования позвоночника проводились в сагитальной и коронарной проекциях. При выявлении опухолевого компонента, распространяющегося в спинно-мозговой канал, выполнялась ИП T2FSE в аксиальной проекции (табл. 1). Исследование костей таза проводилось в T2STIR коронарной (TR = 4940, TE = 30,3, FOV = 40 × 40), T2FSE аксиальной (TR = 5500, TE = 107, FOV = 40 × 40), T1FSE аксиальной (TR = 1400, TE = 23,6, FOV = 40 × 40), T2STIR аксиальной (TR = 5100, TE = 27,8, FOV = 40 × 40) проекциях (табл. 2).

Для анализа полученных при МРТ изображений использовали программу «ЛИНС МАХАОН. Рабочая станция врача. Версия 3.3». На МРТ-изображениях определяли характер поражения и проводили подсчет очагов инфильтрации костного мозга до и после ауто-ТГСК. Очагом инфильтрации костного мозга считали очаг измененного МР-сигнала, гиперинтенсивный на T2FSE и T2STIR, гипоинтенсивный на T1SE, размером ≥ 5 мм. Во внимание принимали также диффузную инфильтрацию костного мозга как средней (гиперинтенсивный МР-сигнал в T1ВИ по отношению к межпозвоночному диску), так и высокой степени выраженности (изоинтенсивный МР-сигнал в T1ВИ по отношению к межпозвоночному диску).

Для определения суммарного объема поражения костного мозга проводился подсчет опухолевой массы по данным МРТ по следующей методике: выявленные очаги и участки инфильтрации костного мозга с учетом интервалов интенсивности сигналов были маркированы с помощью инструмента Regions of interests (ROI) и сегментированы в режиме трехмерной реконструкции. Затем определяли долю выявленных изменений костного мозга от общего объема маркированных областей под контролем исходного изображения. После выделения всех очагов и участков инфильтрации рассчитывали общую величину измененного МР-сигнала для каждого больного, что расценивалось как общий объем опухолевой массы. Анализ МРТ-изображений независимо осуществлялся двумя рентгенологами в заслепленном режиме без доступа к информации о фазе противоопухолевого ответа после проведенного лечения.

При статистическом анализе для оценки различий в определяемых характеристиках до и после ауто-ТГСК использовали парный критерий Стьюдента (распреде-

**Таблица 1.** Характеристики импульсных последовательностей в протоколе МРТ позвоночника  
**Table 1.** Characteristics of pulse sequences in the MRI protocol of the spine

Параметры исследования <i>Parameters of study</i>	Технические характеристики импульсных последовательностей <i>Technical characteristics of sequences</i>			
	T2FSE	T1SE	T2STIR	Myelo
Толщина среза, мм <i>Slice thickness, mm</i>	4,5	4,5	5,0	60
Проекции <i>Planes</i>	Сагиттальная, аксиальная <i>Sagittal, axial</i>	Коронарная <i>Coronary</i>	Сагиттальная, коронарная <i>Sagittal, coronary</i>	Сагиттальная <i>Sagittal</i>
Время повторения (TR / repetition time), мс <i>TR / repetition time, ms</i>	2500	500	5100	1545
Время эхо (TE / Echo time), мс <i>TE / Echo time, ms</i>	105; 118	18	34,4	1387
Поле обзора (FOV / Field of view), см <i>FOV / Field of view</i>	25 × 25; 51 × 51	25 × 25	32 × 32	35 × 35

**Таблица 2.** Характеристика импульсных последовательностей в протоколе МРТ костей таза  
**Table 2.** Characterization of sequences in the MRI protocol of pelvic bones

Параметры исследования <i>Parameters of study</i>	Технические характеристики импульсных последовательностей <i>Technical characteristics of sequences</i>		
	T2FSE	T1FSE	T2STIR
Толщина среза, мм <i>Slice thickness, mm</i>	5,0 thk/1,0 sp	6,0 thk/1,0 sp	6,0 thk/1,0 sp
Проекции <i>Planes</i>	Аксиальная <i>Axial</i>	Аксиальная <i>Axial</i>	Коронарная, аксиальная <i>Coronary, axial</i>
Время повторения (TR / repetition time), мс <i>TR / repetition time, ms</i>	5500	1400	5100
Время эхо (TE / Echo time), мс <i>TE / Echo time, ms</i>	107	23,6	30,3; 27,8
Поле обзора (FOV / Field of view), см <i>FOV / Field of view</i>	40 × 40	40 × 40	40 × 40

ления характеристик статистически значимо не отличались от нормального распределения). Для расчетов использовали статистический пакет Statistica 10.

## Результаты

В анализ были включены 80 МР-томограмм, выполненных 40 больным в двух контрольных точках: до и после ауто-ТГСК. После завершения индукционного этапа противоопухолевый ответ, согласно критериям IMWG, расценивался как ПР у 15 (37,5%) больных, как очень хорошая частичная ремиссия (ОХЧР) у 18 (45%) и как ЧР — у 7 (17,5%) больных. До выполнения ауто-ТГСК нормальная картина костного мозга на МРТ была выявлена у 7 больных, очаговые изменения определялись у 33 больных, при этом количество очагов составляло от 1 до 80 (в среднем  $9 \pm 16$  очагов). Распределение больных в зависимости от количества

выявленных очагов поражения костного мозга было следующим: от 1 до 10 очагов — у 25 (75%) больных, от 11 до 20 очагов — у 5 (15%), более 20 очагов у 3 (10%) больных. Общий объем опухолевой массы, определенной до ауто-ТГСК, варьировал от 1,15 до 212,32 см<sup>3</sup> (в среднем  $19 \pm 37$  см<sup>3</sup>).

Через 100 дней после первой ауто-ТГСК число больных с ПР возросло до 24 (60%), ОХЧР была выявлена у 12 (30%) и ЧР — у 4 (10%) больных. Очаговые изменения костного мозга, по данным МРТ, после ауто-ТГСК были выявлены у тех же 33 больных, при этом количество очагов поражения несколько снизилось и составляло от 1 до 56 (в среднем  $6 \pm 11$ ). Распределение больных в зависимости от количества выявленных очагов поражения после ауто-ТГСК было следующим: от 1 до 10 очагов — у 27 (82%) больных, от 11 до 20 очагов — у 4 (12%), более 20 очагов — у 2 (6%) больных.

Общий объем опухолевой массы после ауто-ТГСК также уменьшился и варьировал от 0,48 до 103,1 см<sup>3</sup> (в среднем 10 ± 20 см<sup>3</sup>).

При сопоставлении количества очагов поражения и объема опухоли по данным МРТ до и после ауто-ТГСК уменьшение количества очагов наблюдалось у 17 (52%) больных, а редукция объема опухолевой массы — у 29 (88%) больных. Таким образом, по сравнению с подсчетом количества очагов поражения костного мозга определение объема опухолевой массы является более чувствительным параметром, позволяющим оценить результаты лечения.

Проведенный нами статистический анализ полученных результатов подтвердил достоверное снижение вовлечения костного мозга в опухолевый процесс после выполнения высокодозной химиотерапии и ауто-ТГСК. Рис. 1 иллюстрирует уменьшение количества очагов поражения костного мозга ( $p = 0,02$ ), рис. 2 — изменение объема опухолевой массы ( $p = 0,01$ ) по данным МРТ до и после ауто-ТГСК.

На основании изменения показателей поражения костного мозга по данным МРТ до и после ауто-ТГСК был оценен противоопухолевый эффект высокодозной терапии мелфаланом. В исследование были включены больные, у которых перед ауто-ТГСК была ПР или ОХЧР (по стандартным критериям IMWG, 2014 г.). В группе больных с ПР до ауто-ТГСК количество очагов поражения костного мозга составляло от 1 до 80 (в среднем  $14 \pm 21$ ), объем опухоли варьировал от 1,15 до 49,95 см<sup>3</sup> (в среднем  $18 \pm 21$  см<sup>3</sup>). После ауто-ТГСК количество очагов поражения уменьшилось и составило от 1 до 56 очагов (в среднем  $9 \pm 14$ ); объем опухоли также уменьшился и составлял от 0,48 до 31,89 см<sup>3</sup> (в среднем  $9 \pm 13$  см<sup>3</sup>). Уменьшение количества очагов поражения отмечено у 8 (62%) больных, в то время как снижение

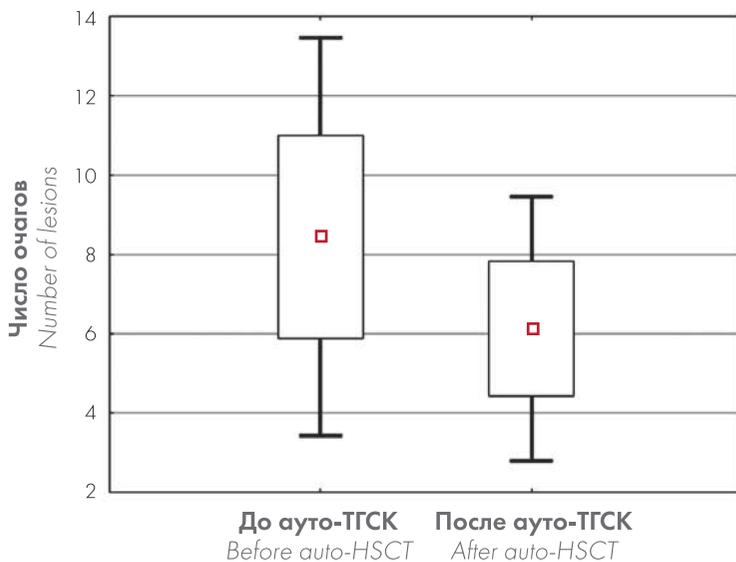
объема опухоли выявлено у 12 (92%) больных (табл. 3). В среднем для всей группы больных после ауто-ТГСК количество очагов поражения костного мозга уменьшилось в 1,4 раза, а объем опухоли — в 2,4 раза.

В группе больных, находившихся в ОХЧР до ауто-ТГСК, количество очагов составляло от 1 до 66 (в среднем  $8 \pm 17$ ), объем опухоли варьировал от 1,86 до 212,32 см<sup>3</sup> (в среднем  $27 \pm 57$  см<sup>3</sup>). После ауто-ТГСК количество очагов снизилось до 1–40 (в среднем  $5 \pm 10$ ), объем опухоли также снизился и составлял от 0,9 до 103,1 см<sup>3</sup> (в среднем  $13 \pm 27$  см<sup>3</sup>). Уменьшение количества очагов поражения отмечено у 7 (54%) больных, уменьшение объема опухоли — у 12 (92%) больных (табл. 4). В среднем для всей группы после выполнения ауто-ТГСК количество очагов поражения костного мозга уменьшилось в 1,4 раза, а объем опухоли — в 2,6 раза. После ауто-ТГСК 4 (31%) больных из этой группы достигли ПР.

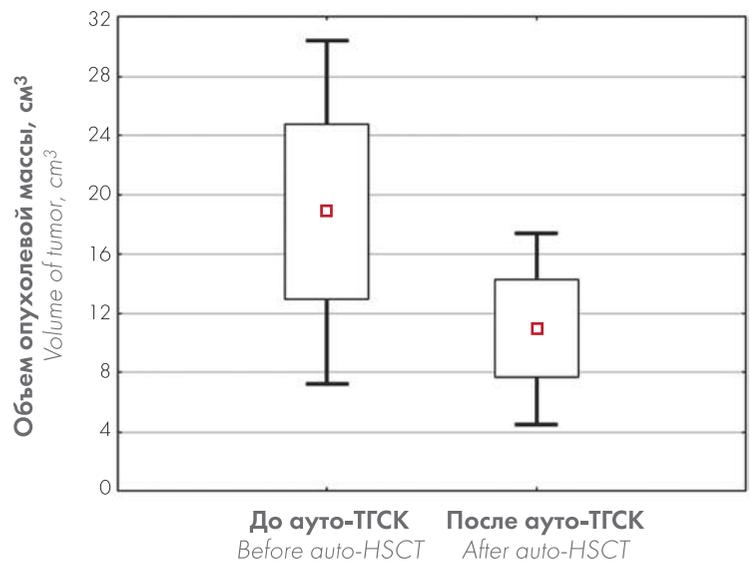
## Обсуждение

Результаты исследования показали, что у большинства больных ММ при достижении значимого противоопухолевого ответа (ПР или ОХЧР) при МРТ выявляется остаточное опухолевое поражение костного мозга. Высокодозная терапия мелфаланом с последующей ауто-ТГСК дает дополнительный противоопухолевый эффект, что подтверждается уменьшением как количества очагов поражения, так и объема опухолевой массы в костном мозге. При этом наиболее выраженный положительный эффект наблюдался у больных, достигших ПР уже на этапе индукционной терапии, до ауто-ТГСК.

Определение влияния ауто-ТГСК как эффективного этапа программной терапии больных ММ на изменения в результатах МРТ костного мозга проводилось и в других исследованиях. В работе Hillengass



**Рисунок 1.** Число очагов поражения костного мозга до и после ауто-ТГСК.  
**Figure 1.** Number of bone marrow lesions before and after auto-HSCT.



**Рисунок 2.** Объем опухолевой массы до и после ауто-ТГСК.  
**Figure 2.** Volume of tumor before and after auto-HSCT.

**Таблица 3.** Изменение показателей поражения костного мозга по данным МРТ у больных ММ, находившихся в ПР  
**Table 3.** Changes of MRI-indicators of bone marrow damage in patients with MM who were in CR

Пациент <i>Patient</i>	Характеристика МРТ-изображений костного мозга <i>Characteristics of bone marrow MR Images</i>				Кратность уменьшения поражения костного мозга <i>Reduction in bone marrow lesions (times)</i>	
	До ауто-ТГСК <i>Before auto-HSCT</i>		После ауто-ТГСК <i>After auto-HSCT</i>			
	Число очагов <i>Number of foci</i>	Объем опухоли, см <sup>3</sup> <i>Tumor volume, cm<sup>3</sup></i>	Число очагов <i>Number of foci</i>	Объем опухоли, см <sup>3</sup> <i>Tumor volume, cm<sup>3</sup></i>	Число очагов <i>Number of foci</i>	Объем опухоли, см <sup>3</sup> <i>Tumor volume, cm<sup>3</sup></i>
1	4	3,22	2	0,74	2,0	4,4
2	2	23,05	2	6,42	1,0	3,6
3	10	3,66	7	2,83	1,4	1,3
4	14	67,6	10	38,09	1,4	1,8
5	1	1,4	1	0,48	1,0	2,9
6	16	49,95	13	31,89	1,2	1,6
7	3	1,24	3	0,54	1,0	2,3
8	13	10,79	8	5,35	1,6	2,0
9	3	1,82	3	0,57	1,0	3,2
10	24	12,84	12	6,51	2,0	2,0
11	80	39,51	56	27,73	1,4	1,4
12	1	1,15	1	1,15	1,0	1
13	15	17,15	9	4,68	1,7	3,7
<b>В среднем</b> <i>Average</i>	14 ± 21	18 ± 21	9 ± 14	9 ± 13	1,4	2,4

et al. [10] выполнен ретроспективный анализ МР-томограмм всего тела у 100 больных ММ. В период с октября 2004 г. по июль 2010 г. в исследовании участвовали 58 мужчин и 42 женщины (медиана возраста 58 лет), которым выполняли МРТ костей скелета в двух контрольных точках — до специфической противоопухолевой терапии (мелфалан, 200 мг/м<sup>2</sup>) и после ауто-ТГСК. Одна ауто-ТГСК была выполнена 45 больным, две ауто-ТГСК — 55 больным. Время между первой МРТ и началом терапии составляло 0,4 месяца (диапазон 0—3,9 месяца), а между ауто-ТГСК и второй МРТ — 5,6 месяца (диапазон 0,4—39,3 месяца). Временной интервал между первой и второй МРТ варьировал от 6 до 45 месяцев.

Авторы оценили количество очагов и характер поражения костного мозга без введения контрастного препарата. При первичном исследовании очаговые поражения костного мозга были выявлены у 77 больных: от 1 до 10 очагов поражения у 35 больных, от 11 до 20 очагов — у 15 больных, более 20 очагов — у 27 больных. Повторная МРТ, проведенная в разные сроки после ауто-ТГСК, выявила очаговые поражения у тех же 77 больных, однако возросло число больных (n = 52) с минимальным количеством очаговых поражений (от 1 до 10). После программной терапии противоопухо-

левый ответ расценивался как ПР у 11 больных, как ЧР — у 74 больных, стабилизация заболевания отмечалась у 7 больных и прогрессия — у 8. Авторы отметили, что данные МРТ добавляют важную информацию в стандартную оценку противоопухолевого ответа, принятую международной рабочей группой по изучению ММ [24], поскольку МРТ позволяет с большей чувствительностью и специфичностью определить остаточную опухолевую массу у больных ММ после лечения.

Использованный в настоящем исследовании метод оценки объема опухолевой ткани посредством МРТ является перспективным, так как позволяет измерить величину поражения костного мозга и может стать одним из критериев выбора тактики последующего противоопухолевого лечения, в частности показанием для поддерживающей терапии [25].

В связи с тем, что у трети больных ММ поражение костного мозга носит очаговый характер, локальное исследование костномозгового кровотока с помощью пункции или трепанобиопсии в ряде случаев не дает возможности выявить клональные опухолевые клетки. МРТ является дополнительным неинвазивным методом оценки ответа на проведенную противоопухолевую терапию, поскольку позволяет опреде-

**Таблица 4.** Изменение показателей поражения костного мозга по данным МРТ у больных ММ, находившихся в ОХЧР**Table 4.** Changes of MRI-indicators of bone marrow damage in MM patients who were in VGPR

Пациент Patient	Характеристика МРТ-изображений костного мозга Characteristics of bone marrow MR Images				Кратность уменьшения поражения костного мозга Reduction in bone marrow lesions (times)		Ответ после ауто-ТГСК Response after auto-HSCT
	До ауто-ТГСК Before auto-HSCT		После ауто-ТГСК After auto-HSCT		Число очагов Number of foci	Объем опухоли, см <sup>3</sup> Tumor volume, cm <sup>3</sup>	
	Число очагов Number of foci	Объем опухоли, см <sup>3</sup> Tumor volume, cm <sup>3</sup>	Число очагов Number of foci	Объем опухоли, см <sup>3</sup> Tumor volume, cm <sup>3</sup>			
1	2	10,75	1	0,9	2,0	11,9	ПР CR
2	5	8,94	5	6,87	1,0	1,3	ОХЧР VGPR
3	1	2,85	1	1,7	1,0	1,7	ОХЧР VGPR
4	1	2,68	1	2,61	1,0	1,0	ОХЧР VGPR
5	5	5,91	5	5,56	1,0	1,1	ОХЧР VGPR
6	6	7,98	5	3,97	1,2	2,0	ПР CR
7	5	3,11	4	2,87	1,3	1,1	ОХЧР VGPR
8	7	13,7	3	3,04	2,3	4,5	ОХЧР VGPR
9	3	9,25	2	3,75	1,5	2,5	ОХЧР VGPR
10	2	1,86	2	1,15	1,0	1,6	ОХЧР VGPR
11	1	15,32	1	13,13	1,0	1,2	ПР CR
12	5	212,32	2	103,1	2,5	2,1	ОХЧР VGPR
13	66	63,26	40	22,51	1,7	2,8	ПР CR
<b>В среднем</b> Average	8 ± 17	27 ± 57	5 ± 10	13 ± 27	1,4	2,6	

лить наличие остаточного опухолевого субстрата при исследовании всего скелета.

#### Информация об авторах

Соловьев Максим Валерьевич (Solovyev M. V.), врач-гематолог научно-клинического отделения высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; + 7(495) 614-90-42, maxsolovej@mail.ru

Менделеева Лариса Павловна (Mendeleeva L. P.), доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора по научной работе и инновациям, заведующая отделением высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, mendeleeva.l@blood.ru

Яцык Галина Александровна (Yatsyk G. A.), врач-рентгенолог, кандидат медицинских наук, заведующая отделением магнитно-резонансной томографии и ультразвуковой диагностики «НМИЦ гематологии» Минздрава России, yatsyk.g@blood.ru

Луцик Наталья Сергеевна (Lutsik N. S.), врач-рентгенолог отделения магнитно-резонансной томографии и ультразвуковой диагностики ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, natalia.parubenko@gmail.com

Фирсова Майя Валерьевна (Firsova M. V.), врач-гематолог научно-клинического отделения высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, firs-maia@yandex.ru

Гемджян Эдуард Георгиевич (Gemdzian E. G.), старший научный сотрудник лаборатории биостатистики ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, eduardwork@gmail.com

Савченко Валерий Григорьевич (Savchenko V. G.), академик РАН, профессор, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, director@blood.ru

### Литература

1. Менделеева Л. П., Вотякова О. М., Покровская О. С. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы. *Гематология и трансфузиология* 2016; 61:1–24. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-1 (Прил. 2)
2. Соловьев М. В., Менделеева Л. П., Покровская О. С. и др. Эпидемиология множественной миеломы в России (результаты многоцентрового межрегионального исследования). *Гематология и трансфузиология* 2016; 61:28.
25. Соловьев М. В., Менделеева Л. П., Покровская О. С. и др. Множественная миелома: поддерживающая терапия после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от минимальной остаточной болезни. *Терапевтический архив* 2017; 89:25–31. doi.org/10.17116/terarkh201789725-31

Остальные источники см. в References.

### References

1. Mendeleeva L. P., Votyakova O. M., Pokrovskaya O. S. et al. *National clinical guidelines for diagnosis and treatment of multiple myeloma*. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya) 2016; 61:1–24 (in Russian). doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-1.
2. Solovov M. V., Mendeleeva L. P., Pokrovskaya O. S. et al. *Epidemiology of multiple myeloma in Russia (results of a multicenter interregional study)*. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya) 2016; 61:28 (in Russian).
3. Solovov M. V., Mendeleeva L. P., Pokrovskaya O. S. et al. *Epidemiology and clinical characteristics of patients with multiple myeloma*. Results of a prospective multicenter study in Russian Federation. *Blood* 2015; 126:4248. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/4248/tab-e-letters>.
4. Edwards C. M., Zhuang J., Mundy G. R. *The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma*. *Bone* 2008; 42:1007–1013. doi: 10.1016/j.bone.2008.01.027.
5. Roodman G. D. *Pathogenesis of myeloma bone disease*. *Leukemia* 2009; 23:435–441. doi: 10.1038/leu.2008.336.
6. Rajkumar S. V., Dimopoulos M. A., Palumbo A. et al. *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. *The Lancet Oncology* 2014; 15:538–548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
7. Hillengass J., Fechtner K., Weber M.-A. et al. *Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma*. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28:1606–1610. doi: 10.1200/JCO.2009.25.5356.
8. Raza S., Leng S., Lentzsch S. *The critical role of imaging in the management of multiple myeloma*. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2017; 12:168–175. doi: 10.1007/s11899-017-0379-9.
9. Boccadoro M., Pileri A. *Plasma cell dyscrasias: classification, clinical and laboratory characteristics, and differential diagnosis*. *Baillière's Clinical Haematology* 1995; 8:705–719.

10. Hillengass J., Ayyaz S., Kilk K. et al. *Changes in magnetic resonance imaging before and after autologous stem cell transplantation correlate with response and survival in multiple myeloma*. *Haematologica* 2012; 97:1757–1760. doi: 10.3324/haematol.2012.065359.
11. Durie B. G., Salmon S. E. *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival*. *Cancer* 1975; 36:842–854.
12. Chantry A., Kazmi M., Barrington S. et al. *Guidelines for the use of imaging in the management of patients with myeloma*. *British Journal of Haematology* 2017; 178:380–393. doi: 10.1111/bjh.14827.
13. Minarik J., Krhovska P., Hrbek J. et al. *Prospective comparison of conventional radiography, low-dose computed tomography and magnetic resonance imaging in monoclonal gammopathies*. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky* 2016; 160:305–309. doi: 10.5507/bp.2015.064.
14. Baur-Melnyk A., Buhmann S., Durr H. R. et al. *Role of MRI for the diagnosis and prognosis of multiple myeloma*. *Eur J Radiology* 2005; 55:56–63. doi: 10.1016/j.ejrad.2005.01.017.
15. Dimopoulos M., Terpos E., Comenzo R. L. et al. *International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma*. *Leukemia* 2009; 23:1545–1556. doi: 10.1038/leu.2009.89.
16. Bray T. J. P., Singh S., Latifoltojar A. et al. *Diagnostic utility of whole body Dixon MRI in multiple myeloma: A multi-reader study*. *PLoS One* 2017; 12:e0180562c. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180562>.
17. Lasocki A., Gaillard F., Harrison S. *Multiple myeloma of the spine*. *The neuroradiology journal* 2017; 30:259–268. doi: 10.1177/1971400917699426
18. Isoda H., Kojima H., Shimizu K. et al. *Multiple myeloma: short T2 on MR imaging*. *Clinical Imaging* 2001; 25:141–143.
19. Mouloupoulos L. A., Gika D., Anagnostopoulos A. et al. *Prognostic significance of magnetic resonance imaging of bone marrow in previously untreated patients with multiple myeloma*. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2005; 16:1824–1828. doi: 10.1093/annonc/mdi362.
20. Mai E. K., Hielscher T., Kloth J. K. et al. *Association between magnetic resonance imaging patterns and baseline disease features in multiple myeloma: analyzing surrogates of tumour mass and biology*. *European Radiology* 2016; 26:3939–3948. doi: 10.1007/s00330-015-4195-0.
21. Walker R., Barlogie B., Haessler J. et al. *Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: Diagnostic and clinical implications*. *J Clin Oncology* 2007; 25:1121–1128. doi: 10.1200/JCO.2006.08.5803.
22. Mouloupoulos L. A., Dimopoulos M. A., Alexanian R. et al. *Multiple myeloma: MR patterns of response to treatment*. *Radiology* 1994; 193:441–446.
23. Sonneveld P., Avet-Loiseau H., Lonial S. et al. *Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: A consensus of the International Myeloma Working Group*. *Blood* 2016; 127:2955–2962. doi: 10.1182/blood-2016-01-631200.
24. Kumar S., Paiva B., Anderson K. C. et al. *International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma*. *The Lancet Oncology* 2016; 17:328–346. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
25. Solovyyev M. V., Mendeleeva L. P., Pokrovskaya O. S. et al. *Multiple myeloma: Maintenance therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation, depending on minimal residual disease*. *Therapeutic Archive (Terapevicheskiy arkhiv)* 2017; 89:25–31 (In Russian). <https://doi.org/10.17116/terarkh201789725-31>.

# РЕНТГЕНОВСКАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ ТОМОГРАФИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ПОРАЖЕНИЯ КОСТЕЙ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИЗКОДОЗОВОГО И СТАНДАРТНОГО ПРОТОКОЛОВ СКАНИРОВАНИЯ

Computed tomography in the diagnosis and monitoring  
of bone lesions in multiple myeloma using low-dose  
and standard scanning protocols

Костина И. Э., Гитис М. К., Менделеева Л. П., Баграмян А. Ю., Соловьев М. В., Грибанова Е. О., Савченко В. Г.

Kostina I. E., Gitis M. K., Mendeleeva L. P., Bagramyan A. Yu., Solovyev M. V., Gribanova E. O., Savchenko V. G.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Рентгеновская компьютерная томография (КТ) — высокотехнологичный метод медицинской визуализации, позволяющий оценить структуру костей скелета на предмет наличия очагов деструкции, мягкотканых компонентов и патологических переломов, характерных для множественной миеломы (ММ). Данный метод обладает рядом ценных преимуществ в сравнении с широко используемой в диагностике ММ классической рентгенографией костей скелета. Отсутствие существенного различия в лучевой нагрузке при классической рентгенографии костей скелета и низкодозовой КТ позволяет считать последнюю методом выбора для скрининговой оценки наличия и распространенности остеолитического поражения.

**Цели.** Показать возможности рентгеновской компьютерной томографии по низкодозовому протоколу в диагностике ММ, а также выделить характерные структурные изменения костей на фоне лечения.

**Материалы и методы.** Проведено 188 скрининговых КТ-исследований костей скелета в режиме низкодозового сканирования у пациентов с впервые выявленной ММ с последующей оценкой динамики изменений в зонах интереса по стандартному протоколу.

## ABSTRACT

**Introduction.** Computed tomography (CT) is a powerful method of medical imaging that can reveal in skeletal bones foci of destruction, soft tissue masses and pathological fractures characteristic of multiple myeloma (MM). It has a number of valuable advantages over conventional plain-film radiography, which has traditionally been used in the diagnosis of MM. The absence of a significant difference in the radiation load between a plain radiography and a low-dose CT makes the latter the method of choice for screening for presence and extent of osteolytic lesions.

**Objective.** To explore the potential of low-dose computed tomography in the diagnosis of MM and to describe characteristic structural changes of bones during treatment.

**Materials and methods.** One hundred and eighty-eight whole-body low-dose CT scans were performed in patients with newly diagnosed MM followed by monitoring of changes in the areas of interest according to the standard protocol.

**Results.** Osteolytic changes were observed in 91% of patients; 49.6% of patients showed soft-tissue masses spreading beyond the affected bones. Based on the follow-up CT scans according to the standard scanning protocol, we established radiological criteria of a positive response

**Выводы.** В результате исследования у 91% пациентов выявлены остеолитические изменения, у 49,6% пациентов — мягкотканые компоненты, выходящие за пределы пораженных костей. На основании контрольных КТ-исследований по стандартному протоколу сканирования определены рентгенологические критерии ответа на проводимую системную терапию. Впервые в Российской Федерации метод включен в протокол обследования пациентов с ММ.

**Ключевые слова:** низкодозовая компьютерная томография, множественная миелома, остеолитическое поражение скелета, скрининг, рентгенологические критерии ответа

**Для цитирования:** Костина И. Э., Гитис М. К., Менделеева Л. П., Баграмян А. Ю., Соловьев М. В., Грибанова Е. О., Савченко В. Г. Рентгеновская компьютерная томография в диагностике и мониторинге поражения костей при множественной миеломе с использованием низкодозового и стандартного протоколов сканирования. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):113—123  
doi: 10.25837/HAT.2018.13..2..002

**Для корреспонденции:** Костина Ирина Эдуардовна, врач-рентгенолог, кандидат медицинских наук, заведующая отделением рентгенологии и компьютерной томографии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России  
Электронная почта: ikost@list.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.04.2018

Принята к печати 16.05.2018

to antitumor therapy. The method has been included in the Russian multiple myeloma clinical guidelines.

**Keywords:** low-dose computed tomography, multiple myeloma, osteolytic skeletal lesion, screening, X-ray response criteria

**For citation:** Kostina I. E., Gitis M. K., Mendeleeva L. P., Bagramyan A. Yu., Solovyev M. V., Griбанова E. O., Savchenko V. G. *Computed tomography in the diagnosis and monitoring of bone lesions in multiple myeloma using low-dose and standard scanning protocols.* Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):113—123 (in Russian)  
doi: 10.25837/HAT.2018.13..2..002

**For correspondence:** Irina E. Kostina, MD, PhD. Chairman of the Department of Rentgenology and CT, National Research Center for Hematology, Moscow  
E-mail: ikost@list.ru

**Information about authors:**

Kostina I. E., <https://orcid.org/0000-0003-4683-4118>;  
Gitis M. K., <https://orcid.org/0000-0002-0717-2505>;  
Mendeleeva L. P., <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>;  
Bagramyan A. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4970-4626>;  
Solovyev M. V., <https://orcid.org/0000-0002-7944-6202>;  
Griбанова E. O., <https://orcid.org/0000-0002-4155-7820>;  
Savchenko V. G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 05 Apr 2018

Accepted 16 May 2018

## Введение

Множественная миелома (ММ) — это злокачественное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке и/или моче и остеолитическими поражениями костей [1]. Диагностика заболевания базируется на оценке лабораторных параметров крови и мочи, анализе миелограммы и выявлении остеолитических поражений скелета. По данным литературы [2], остеолитические изменения костей выявляются более чем у 90% пациентов и сопровождаются оссалгиями, высоким риском патологических переломов и гиперкальциемией.

В течение последних четырех десятилетий для стадирования заболевания используется классификация Дьюри—Салмона, в которой одним из обязательных критериев является наличие или отсутствие мультифокальных остеолитических изменений [3]. Для диагностики деструктивных изменений костей скелета, в соответствии с Российскими национальными клиниче-

скими рекомендациями по диагностике и лечению множественной миеломы [4], в настоящее время используются классическая рентгенография, компьютерная томография (КТ), низкодозовая КТ и магнитно-резонансная томография (МРТ). Очаги деструкции четко дифференцируются на рентгенограммах при снижении минеральной плотности не менее чем на 30—50%, а мелкие очаги не дифференцируются на рентгенограммах в 30—70% случаев, что отражается на стадировании заболевания [5—7]. Поэтому отсутствие очаговых изменений на рентгенограммах следует расценивать как потенциально ложноотрицательный результат, что делает предпочтительным применение более чувствительных методов исследования, в первую очередь рентгеновской компьютерной томографии [8]. Однако в России по различным причинам (более широкая доступность, низкие материальные затраты и пр.) классическая рентгенография неоправданно продолжает оставаться ведущим методом диагностики ММ.

Таким образом, цель нашей работы — показать возможности рентгеновской КТ, и в частности низкодозовой КТ, в выявлении остеодеструкций и мягкотканых компонентов, обусловленных ММ, а также выделить характерные структурные изменения костей на фоне лечения, диагностируемые при использовании стандартного протокола сканирования.

## Методы исследования

Для оценки распространенности деструктивного процесса в костях скелета и выявления зон наиболее выраженного поражения при ММ в ФГБУ «НМИЦ гематологии» с февраля 2014 г. был введен новый протокол скринингового КТ-исследования с низкой дозой облучения. Задачами данного вида исследования являлись:

- выявление очагов остеодеструкции;
- оценка распространенности деструктивного процесса;
- выявление мягкотканых компонентов, выходящих за пределы кости;
- определение зоны наибольших изменений для последующего мониторинга.

Исследования выполнялись на мультиспиральном рентгеновском компьютерном томографе «Aquilion 64» фирмы Toshiba, с первичной коллимацией 64 × 0,6 мм, толщиной реформированных срезов 1 и 5 мм; последующий анализ изображений проводился с использованием мультипланарной реконструкции. Во время исследования пациент неподвижно располагался на столе томографа в горизонтальном положении с опущенными вдоль тела или поднятыми над головой руками (последнее наиболее актуально для тучных пациентов, в связи с выраженными кольцевыми артефактами на фоне перепада плотностей на границе сред). Исследование проводилось без задержки дыхания.

Длительность сканирования составляла 18–20 секунд. Напряжение тока на лучевой трубке было стан-

дартным — 120 кВ, величина электрического заряда была снижена до 80–100 мАс. Протяженность сканирования составляла 165 см. В зону исследования входили: череп, все отделы позвоночника, грудная клетка, таз, бедренные кости, кости голени (частично или полностью, в зависимости от роста пациента), плечевые кости, частично кости предплечья. Эквивалентная доза облучения составляла не более 5–10 мЗв.

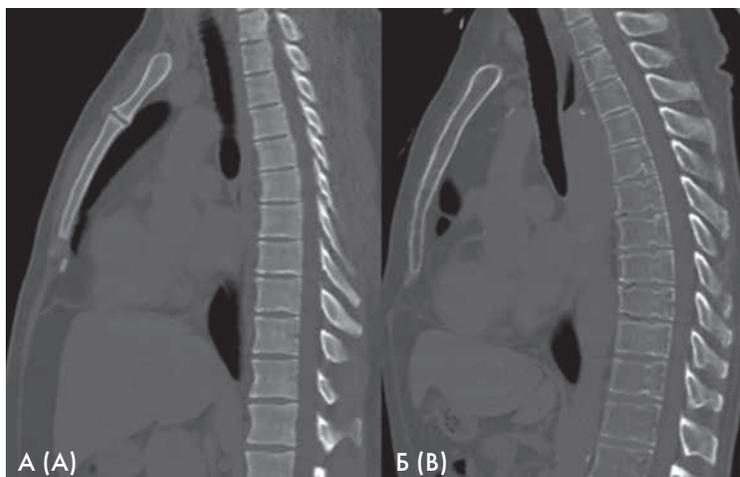
Контрольные КТ-исследования зон или зоны наиболее выраженных структурных изменений выполнялись по стандартным протоколам сканирования для отдельных анатомических областей.

## Результаты

### Характер рентгенологических проявлений ММ

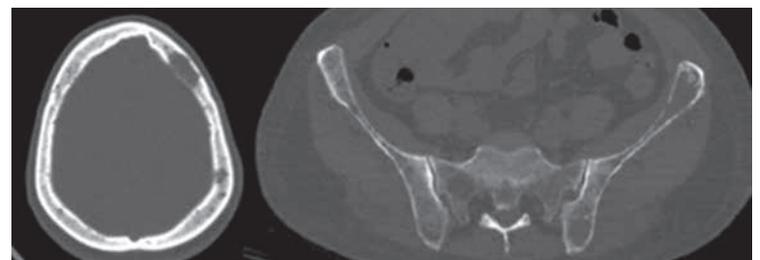
При выполнении КТ-исследований по низкодозовому и стандартному протоколам характерными признаками ММ считались:

- диффузный остеопороз как следствие повышенной резорбции костной ткани (рис. 1), когда увеличивается прозрачность костей, более подчеркнутыми становятся замыкательные пластинки позвонков, корковый слой костей;
- остеодеструктивные изменения, как в виде распространенных участков деструкции округлой, овальной и неправильной формы, с контурами различной степени четкости (рис. 2А), так и в виде мелких, штампованных по типу «пробойника» очагов диаметром до 5 мм (рис. 2Б);



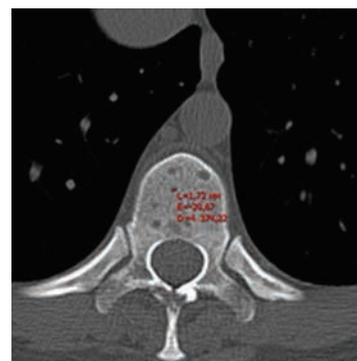
**Рисунок 1.** Нормальная плотность костей (А), диффузный остеопороз (Б).

**Figure 1.** Normal bone density (A), diffuse osteoporosis (B).



**Рисунок 2А.** Распространенные участки деструкции в костях свода черепа и таза.

**Figure 2A.** Diffuse foci of destruction in the bones of the cranial vault and pelvis.



**Рисунок 2Б.** Мелкие очаги деструкции в теле грудного позвонка.

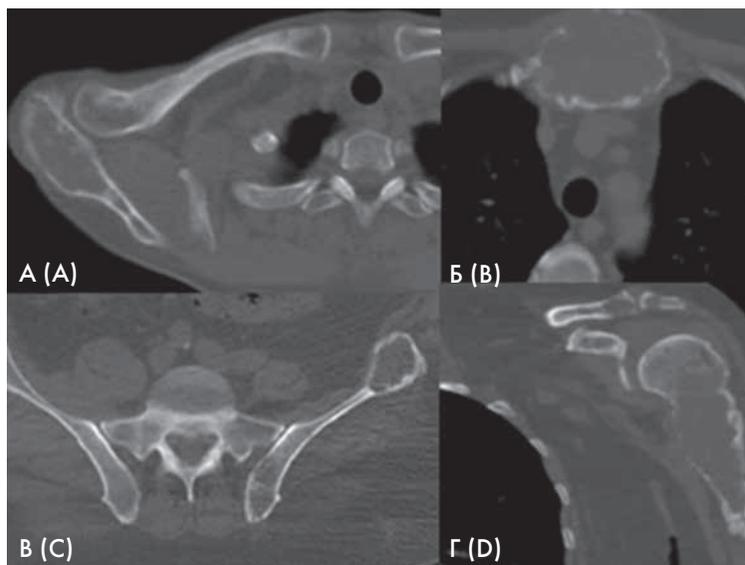
**Figure 2B.** Small foci of destruction in the body of the thoracic vertebra.

- вздутие костей, как правило плоских, когда преимущественно сохранен корковый слой кости, но изменена ее анатомическая форма; значительно реже вздутия определяются в трубчатых костях с излюбленной локализацией в метаэпифизах (рис. 3);
- патологические переломы как на фоне выраженных деструктивных изменений, так и остеопоротических (рис. 4);
- мягкотканые компоненты, выходящие за пределы разрушенной кости с вовлечением в патологический

процесс или смещением смежных анатомических структур (рис. 5);

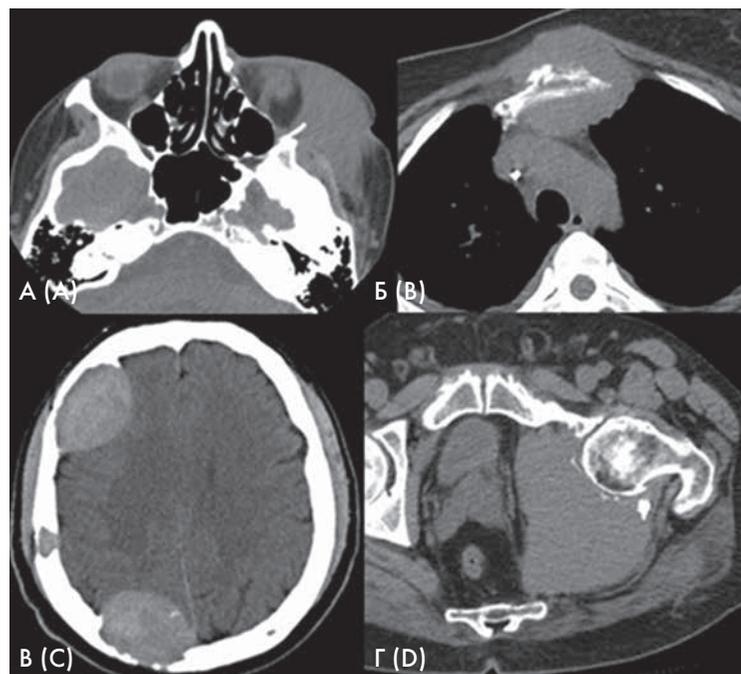
- экстрамедуллярные очаги поражения, представленные четко очерченными образованиями мягкотканной плотности, прилежащими или не прилежащими к костям, без признаков нарушения целостности коркового слоя в последнем (рис. 6).

При использовании современных методов постобработки изображений, таких как мультипланарная реконструкция, зона поражения легко локализовалась



**Рисунок 3.** Вздутия: верхнего угла правой лопатки (А); рукоятки грудины (Б); крыла левой подвздошной кости (В); метафиза и диафиза левой плечевой кости (Г).

**Figure 3.** Bloating: the upper corner of the right scapula (A); manubrium of the sternum (B); wing of the left ilium (C); metaphysis and diaphysis of the left humerus (D).



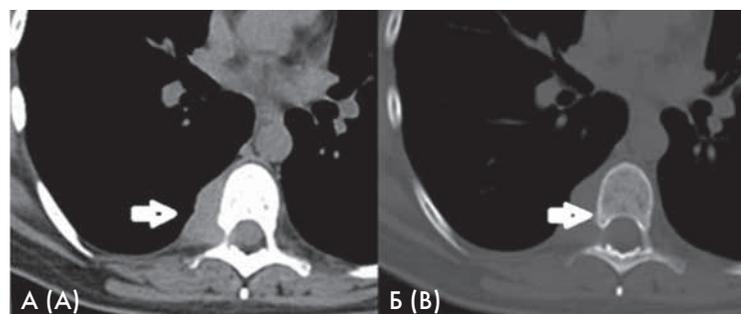
**Рисунок 5.** Массивные мягкотканые компоненты: левой параорбитальной области (А); парастеральной области (Б); интракраниальные (В); левой седалищной области (Г).

**Figure 5.** Massive soft tissue components: left paraorbital region (A); the parasternal region (B); intracranial (C); left ischial region (D).



**Рисунок 4.** Патологические переломы: тел грудных позвонков и грудины (А); правой ключицы (Б); шейки левой бедренной кости (В).

**Figure 4.** Pathological fractures: bodies of thoracic vertebrae and sternum (A); right collarbone (B); neck of the left femur (C).



**Рисунок 6.** Экстрамедуллярный очаг поражения в паравертебральной области правого гемиторакса, широко прилежащий к телу грудного позвонка (А), без признаков нарушения целостности его коркового слоя (Б).

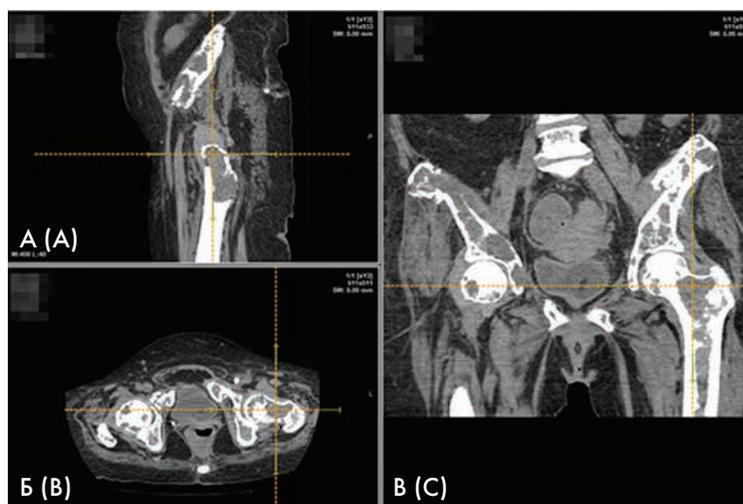
**Figure 6.** Extramedullary disease in the paravertebral region of the right hemithorax, widely adjacent to the body of the thoracic vertebra (A), without signs of a violation of the integrity of its cortical layer (B).

в трех взаимоперпендикулярных плоскостях (рис. 7), что важно для подтверждения наличия мелкого очага, а также играет большую роль при планировании биопсии под контролем КТ (рис. 8). Еще одна современная методика постобработки изображений давала возможность создавать 3D-модели костей, которые помогали врачам наглядно оценить объем поражения костной ткани (рис. 9).

До недавнего времени единственной задачей рентгенолога при диагностике ММ было выявление очагов деструкции и определение их количества (единичные или множественные). Однако в последние годы при выполнении КТ, чаще всего с целью поиска очага инфекции, стали отмечать, что на фоне лечения по-

раженные кости претерпевают структурные изменения. Это было связано с внедрением в клиническую практику новых лекарственных средств, таких как ингибиторы протеосом (бортезомиб, карфилзомиб), иммуномодулирующих препаратов (талидомид, леналидомид, помалидомид) и высокодозных трансплантационных методик. Все это позволило применять рентгеновскую КТ для мониторинга костных изменений у данной группы пациентов.

С учетом накопленного опыта были выделены КТ-критерии положительного ответа на системную терапию: - восстановление целостности коркового слоя кости, как правило, с избыточным, неравномерным увеличением его толщины (рис. 10);



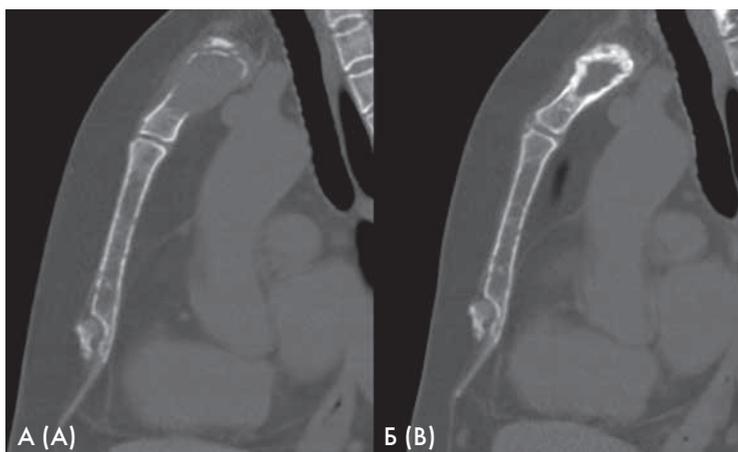
**Рисунок 7.** Обширный очаг деструкции в шейке левой бедренной кости в сагитальной (А), аксиальной (Б) и коронарной (В) проекциях.  
**Figure 7.** Extensive lesion in the neck of the left femur in the sagittal (A), axial (B) and coronary (C) projections.



**Рисунок 8.** Трепанобиопсия под контролем КТ.  
**Figure 8.** CT-guided bone biopsy.



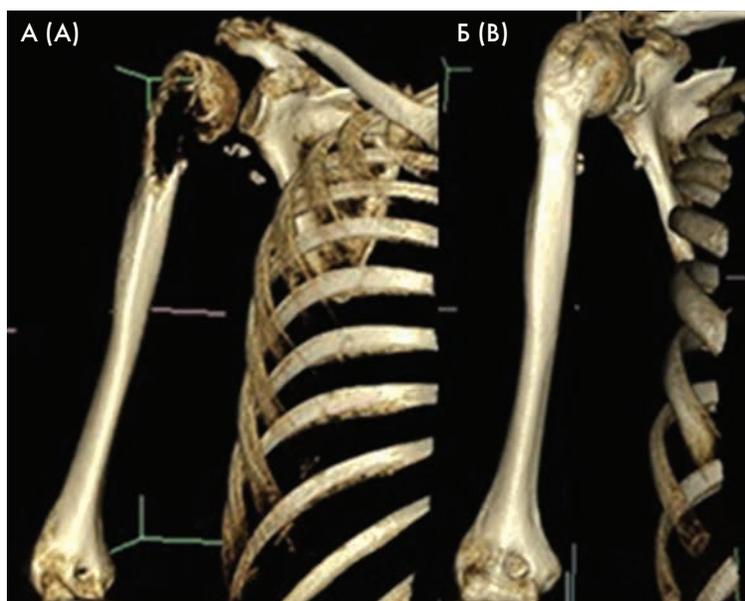
**Рисунок 9.** 3D-модель грудной клетки, плечевого пояса, таза и тазобедренных суставов с выраженным распространенным деструктивным процессом в костях скелета.  
**Figure 9.** Volume rendering of the skeleton showing multiple bone lesions in the chest wall, shoulder girdle, pelvis, and hip joints.



**Рисунок 10.** КТ-изображения грудины в сагитальной проекции до (А) и после (Б) лечения с восстановлением коркового слоя по передней и задней поверхности рукоятки грудины с выраженным неравномерным его утолщением.  
**Figure 10.** CT scans of the sternum in the sagittal projection before (A) and after (B) treatment with restoration of the cortical layer along the anterior and posterior surface of the manubrium with pronounced uneven thickening.

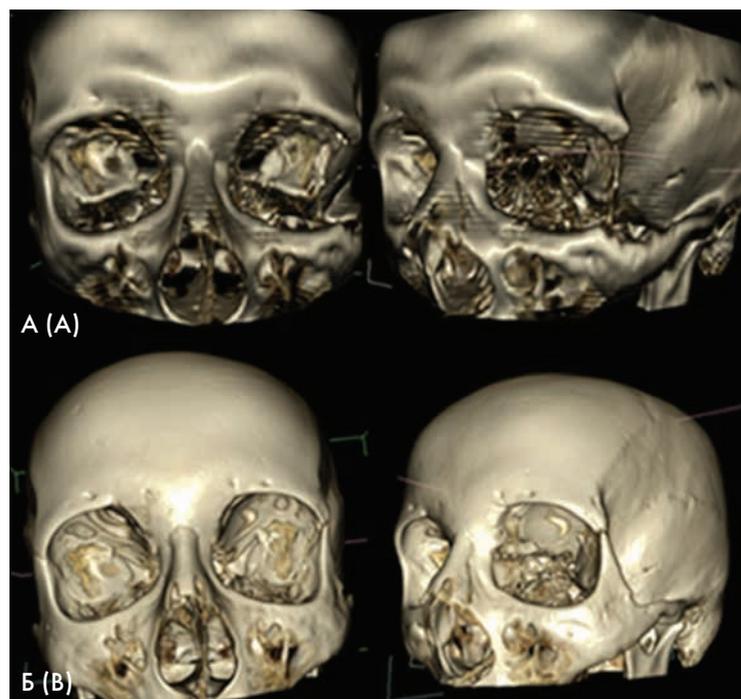
- формирование костной мозоли в местах патологических переломов костей (рис. 11);
- появление костных балок в участках деструкции (ремоделирование костей) (рис. 12, 13);
- формирование «ободков» остеосклероза вокруг очагов деструкции (рис. 14);
- уменьшение выраженности вздутия кости за счет регрессии мягкотканного содержимого очага деструкции (рис. 15);

- уменьшение размеров мягкотканного содержимого в очаге деструкции (рис. 16);
- жировая инволюция мягкотканного содержимого очага деструкции/мягкотканного компонента (рис. 17);
- уменьшение размеров/полная регрессия мягкотканного компонента, выходящего за пределы кости, регрессия вовлечения в патологический процесс прилежащих анатомических структур (рис. 18).



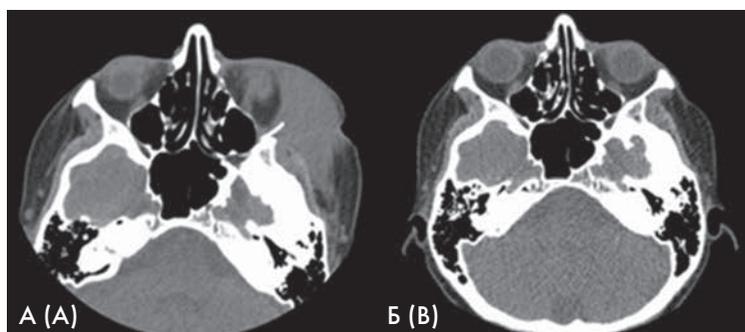
**Рисунок 11.** 3D-модель правой плечевой кости до (А) и после (Б) лечения с восстановлением коркового слоя проксимального метаэпифиза и консолидацией патологического перелома.

**Figure 11.** Volume rendering of the right humerus before (A) and after (B) treatment with restoration of cortical layer of proximal meta-epiphysis and consolidation of pathological fracture.



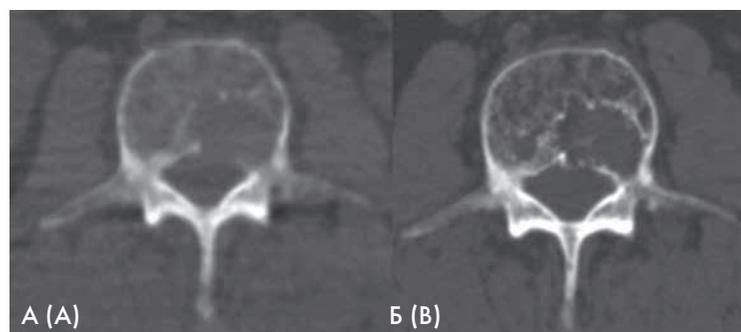
**Рисунок 13.** 3D-модели лицевого черепа того же пациента до (А) и после (Б) лечения с полным восстановлением лобного отростка левой скуловой кости и скулового отростка лобной кости.

**Figure 13.** Volume rendering of the facial skull of a patient before (A) and after (B) treatment, showing complete restoration of the frontal process of the left zygomatic bone and the zygomatic process of the left frontal bone.



**Рисунок 12.** КТ-изображения параорбитальной области до (А) и после (Б) лечения с полной регрессией мягкотканного компонента и полным восстановлением анатомической формы и структуры левой скуловой кости.

**Figure 12.** CT scans of the paraorbital region before (A) and after (B) treatment with complete regression of the soft tissue component and complete restoration of the anatomical shape and structure of the left zygomatic bone.



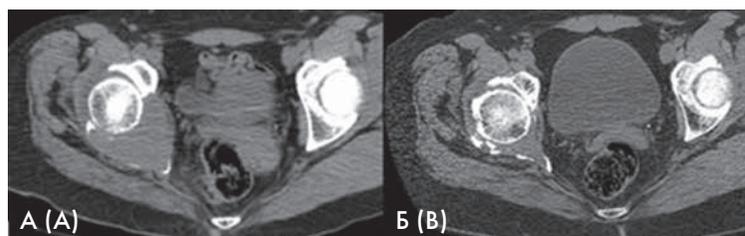
**Рисунок 14.** КТ-изображения тела поясничного позвонка до (А) и после (Б) лечения с формированием ободка остеосклероза вокруг очага деструкции и восстановлением задней замыкательной пластинки.

**Figure 14.** CT images of the body of a lumbar vertebra before (A) and after (B) treatment, showing the formation of a rim of osteosclerosis around the lesion and restoration of the posterior surface of the endplate.

В случае замещения мягкотканного содержимого/компонента фиброзной тканью достоверная оценка активности заболевания посредством КТ становится невозможной. В данной ситуации метод позволяет лишь оценить размеры остаточной «мягкой ткани». Для дифференциальной КТ-диагностики опухолевой ткани и остаточных фиброзных изменений можно использовать метод болюсного контрастного усиления с применением неионных рентгеноконтрастных препара-

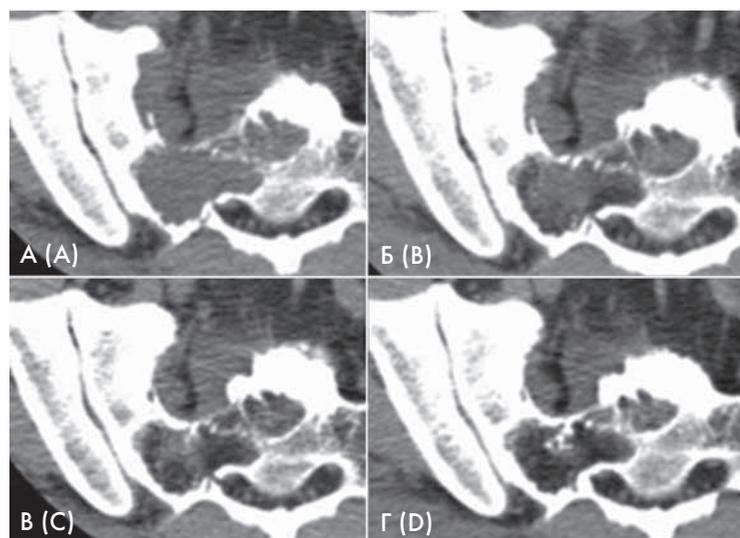
тов, при котором оценивается степень накопления контрастного препарата исследуемой тканью. Однако данный метод можно применять только у пациентов с сохранной функцией почек. Если данное исследование провести невозможно, целесообразно применение других высокотехнологичных методов визуализации — МРТ, ПЭТ.

С февраля 2014 г. по март 2018 г. были проведены 288 исследований костей скелета у пациентов с ММ по



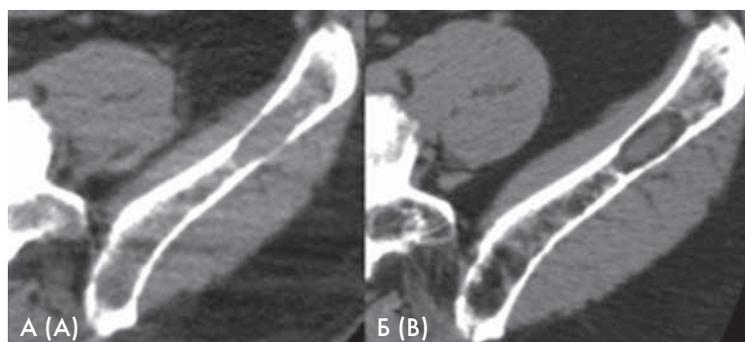
**Рисунок 15.** КТ-изображения тела правой седалищной кости до (А) и после (Б) лечения с выраженным уменьшением вздутия кости и значительной регрессией мягкотканного компонента.

**Figure 15.** CT scans of the right sciatic bone body before (A) and after (B) treatment with a pronounced decrease in bloating and a significant regression of the soft tissue component.



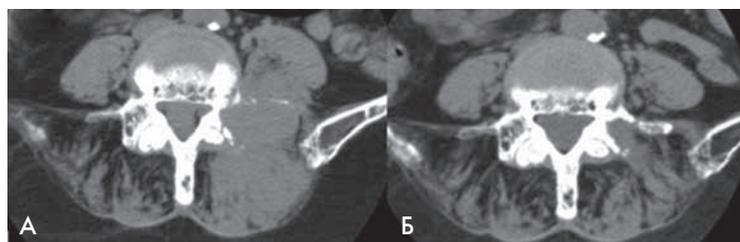
**Рисунок 17.** КТ-изображения правых боковых масс крестца до лечения (А), через 9 месяцев (Б), через 1 год и 2 месяца (В) и через 3,5 года (Г) от начала лечения с постепенной жировой инволюцией мягкотканного содержимого и частичным появлением костных балок в очаге деструкции.

**Figure 17.** CT scans of the right lateral mass of the sacrum before treatment (A) and 9 months (B), 1 year and 2 months (C), and 3.5 years (D) after the onset of treatment, showing gradual fatty involution of the soft tissue content of the lesion and appearance of some bony trabeculae in the lesion.



**Рисунок 16.** КТ-изображения крыла левой подвздошной кости до (А) и после (Б) лечения с уменьшением размеров мягкотканного содержимого в очаге деструкции и появлением ободка жировой ткани вокруг содержимого.

**Figure 16.** CT scans of the left iliac wing before (A) and after (B) treatment showing a shrinking of the soft tissue content of the lesion and development of a rim of adipose tissue around it.



**Рисунок 18.** КТ-изображения тела L5 позвонка до (А) и после (Б) лечения с выраженным уменьшением объема мягкотканного компонента в разрушенном левом поперечном отростке с частичным восстановлением его костной структуры и значительной регрессией специфического поражения мышц спины и забрюшинной клетчатки.

**Figure 18.** CT scans of the body of L5 vertebra before (A) and after (B) treatment showing a marked reduction of soft tissue in the destroyed left transverse process with partial restoration of its bony structure and significant improvement of the damage to the muscles of the back and retroperitoneal tissues.

протоколу низкодозовой КТ. Из них 188 исследований было проведено у пациентов с впервые выявленной ММ.

В результате проведенного анализа у пациентов с впервые выявленной ММ были выявлены следующие изменения:

- диффузный остеопороз без достоверных очагов деструкции — у 27 (14,4%) пациентов;
- наличие остеодеструкций — у 157 (83,5%) пациентов, из них единичные очаги (до 5 шт.) — у 14 (8,9%) пациентов, множественные очаги — у 143 (91%) пациентов;
- единичный очаг поражения — у 4 (2,1%) пациентов;
- наличие мягкотканного компонента, выходящего за пределы костей, — у 80 (49,6%) пациентов.

Аналогичное исследование костей скелета выполнялось и при выявлении рецидива заболевания. Всего проведено 10 таких исследований, в результате которых при сравнении с первичными данными были выявлены:

- новые очаги деструкции — у 4 (40%) пациентов;
- экстрамедуллярные очаги поражения — у 1 (10%) пациента;
- мягкотканый интрамедуллярный компонент в каналах бедренных костей — у 1 (10%) пациента;
- отсутствие новых рентгенологических изменений — у 4 (40%) пациентов.

## Обсуждение

Мультисрезовая КТ обладает широким спектром диагностических возможностей. Применительно к диагностике ММ к ним следует отнести достоверное выявление остеолитических очагов в костях скелета размером менее 5 мм, возможность детальной визуализации структуры остеолитических изменений без суммационного эффекта, связанного с «проекционным наложением» смежных анатомических структур, оценку наличия и распространенности мягкотканного компонента в очагах деструкции и за их пределами. Возможность точной локализации очагов в трех взаимоперпендикулярных плоскостях с использованием режима мультипланарной реконструкции позволяет осуществлять навигацию при взятии материала для биопсии. Построение трехмерных моделей костей упрощает визуальное восприятие объема поражения скелета врачами.

Помимо этого, метод позволяет оценивать сопутствующую патологию в зоне сканирования. Короткое время сканирования и минимизация риска травмирования пациента во время исследования позволяют использовать метод для динамического наблюдения в соответствии с заданным стандартным протоколом [9, 10].

Однако лучевая нагрузка на пациента при КТ выше, чем при классической рентгенографии, метод обладает низкой чувствительностью при диффузной форме ММ, а также имеет невысокую достоверность при оценке активности опухолевого процесса [3]. Для снижения лучевой нагрузки на пациента в последние

годы все чаще используется КТ с низкой дозой облучения. Метод позволяет в скрининговом режиме за один раз исследовать структуру всех костей скелета на предмет наличия очагов деструкции, мягкотканых компонентов и патологических переломов, характерных для ММ.

По сравнению со стандартным протоколом рентгенологического обследования (рентгенография черепа, позвоночника, таза, костей плечевого пояса, ребер, длинных трубчатых костей) метод позволяет более детально изучить структуру костной ткани за счет получения тонкосрезовых и полипроекционных изображений. При этом пациент при проведении исследования находится в неподвижном положении лежа на спине, что исключает погрешности в выполнении стандартных укладок, а также риск травмирования пораженных костей при перемещении пациента, чего иногда невозможно избежать при выполнении классических рентгенограмм. Длительность КТ-исследования составляет 18–20 секунд, посещение пациентом кабинета КТ занимает не более 5–10 минут, тогда как при стандартном рентгенологическом обследовании для получения 16–18 рентгенограмм требуется не менее 1 часа. Индивидуальная эффективная доза облучения пациента при исследовании методом низкодозовой КТ всего скелета сопоставима с исследованием одной зоны по стандартному протоколу КТ или комплексному классическому рентгенологическому исследованию и составляет около 5–10 мЗв.

Создание протокола исследования с низкой дозой облучения возможно на любом современном КТ-сканере. Для этого изменяются такие параметры сканирования, как величина электрического заряда (мАс) и скорость движения стола при сохранении стандартного напряжения тока на лучевой трубке. Изменение параметров влечет за собой снижение соотношения сигнал/шум, обуславливая некую «размытость» изображения и наличие артефактов, что не позволяет использовать низкодозовую КТ всего тела для точного измерения распространенности и детального анализа структуры очагов деструкции, мягкотканых компонентов и сопутствующей патологии внутренних органов. Однако применение метода в качестве скринингового, при первичном обследовании пациента с подозрением на ММ, позволяет выбрать зону интереса, которую при последующем динамическом КТ-наблюдении возможно исследовать по стандартному КТ-протоколу с более высоким пространственным разрешением и адекватным соотношением сигнал/шум. Таким образом, данная методика является уникальной для скринингового выявления случаев ММ, позволяя оценить распространенность деструктивного процесса при малых затратах времени и большей безопасности для пациента по сравнению с классическим рентгенологическим исследованием костей скелета при сопоставимой лучевой нагрузке [11].

КТ имеет свой предел информативности: она не позволяет визуализировать инфильтрацию костного мозга; кроме того, метод малоинформативен в отношении оценки структуры нервных корешков и оболочек мозга. В этих случаях показано выполнение МРТ в связи с ее высокой чувствительностью к изменениям костного мозга и мягких тканей. В отличие от КТ, МРТ позволяет визуализировать специфическую инфильтрацию костного мозга до формирования деструкции кости, оценить распространенность инвазии опухоли в параоссальные мягкотканые структуры и позвоночный канал, а также выявить компрессионное воздействие костных отломков и мягкотканного компонента на кровеносные сосуды и нервы [12]. Метод является незаменимым при «тлеющей», «КТ-негативной» ММ. Помимо этого МРТ позволяет дифференцировать доброкачественные и злокачественные переломы, не оказывает лучевой нагрузки на пациента и может использоваться для динамического наблюдения [6]. К недостаткам метода по сравнению с КТ следует отнести более низкую выявляемость костно-деструктивных изменений, особенно в отношении мелких очагов деструкции; невозможность исследовать пациентов с искусственными водителями ритма, ферромагнитными имплантатами и клаустрофобией; ограничения в исследовании пациентов с выраженным болевым синдромом из-за длительности процедуры [6].

В последние годы в диагностические протоколы все чаще вводится позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ). Это метод визуализации, основанный на применении радиофармпрепаратов, меченных позитрон-излучающими ультракороткоживущими радионуклидами. Для клинических целей чаще всего применяют фтордезоксиглюкозу (ФДГ). Данный препарат сильнее накапливается в областях с высоким метаболизмом, что делает ПЭТ с ФДГ незаменимым в выявлении активного опухолевого процесса и метастазов. ПЭТ является «функциональной» томографией, позволяя неинвазивно и количественно оценивать ряд физиологических и биохимических процессов, в отличие от КТ и МРТ, которые позволяют оценивать активность опухоли лишь по относительно косвенным признакам и ориентированы прежде всего на оценку структурных изменений в тканях. Недостатками ПЭТ являются: возможность ложноположительных результатов в связи с неверной интерпретацией воспалительных очагов; высокая стоимость исследования; малая доступность; высокая доза облучения по сравнению с КТ; ограниченное применение у пациентов с сахарным диабетом.

Таким образом, каждый из методов медицинской визуализации обладает своими преимуществами и недостатками, различается по чувствительности и специфичности по отношению к разным патоморфологическим проявлениям. Вследствие этого нельзя выделить ведущий метод диагностики, и обычно они

дополняют друг друга. В литературе сложилось мнение о новом «золотом стандарте» диагностики поражений скелета при ММ, включающем КТ, МРТ всего тела и ПЭТ (раздельно или в режиме ПЭТ-КТ/МРТ). Данные этих методов исследования учитываются в обновленной системе стадирования «Дьюри—Салмон Плюс» [13—15], других современных американских и европейских рекомендациях по стадированию и мониторингу [4, 9, 18].

Средние значения чувствительности и специфичности описанных методов, согласно литературным данным [15—17], представлены в табл. 1.

С учетом представленных данных, современная лучевая диагностика ММ должна базироваться на высокотехнологичных методах визуализации, в т. ч. рентгеновской КТ, которая играет важную роль в качестве самостоятельного метода визуализации; по мере улучшения оснащённости клиник России современными компьютерными томографами этот метод становится все более доступным. Для уменьшения лучевой нагрузки на пациентов классическая рентгенография должна использоваться лишь в случаях патологических переломов.

Таким образом, рентгеновская КТ является высокочувствительным, документируемым, независимым от оператора, достоверным методом диагностики остеодеструкций и мягкотканых компонентов при ММ. Используя низкодозовую КТ всего тела как скрининговый метод, можно быстро, с небольшими материальными затратами подтвердить или опровергнуть наличие остеодеструктивного процесса, мягкотканых компонентов и патологических переломов, характерных для ММ, минуя этап классической рентгенографии. При исследовании практически исключается риск травмирования пораженных костей. Метод позволяет оценить клинически значимую сопутству-

**Таблица 1.** Средние значения чувствительности и специфичности методов медицинской визуализации

**Table 1.** Mean values of sensitivity and specificity of methods of medical imaging

Метод <i>Imaging methods</i>	Чувствительность (%) <i>Sensitivity (%)</i>	Специфичность (%) <i>Specificity (%)</i>
Рентгенография костей скелета <i>X-ray of the skeleton</i>	47,4	29,4
Низкодозовая КТ всего тела <i>Low-dose CT</i>	70	55,6
МРТ всего тела <i>whole body MRI</i>	83,3	83
ПЭТ-КТ <i>PET-CT</i>	91	75

ющую патологию внутренних органов в зоне сканирования. Немаловажным является то, что лучевая нагрузка сопоставима с нагрузкой при классическом комплексном рентгенологическом исследовании, а информативность и достоверность исследования значительно выше. Метод может использоваться для выявления новых остеодеструкций и экстрамедуллярных поражений при рецидивах заболевания.

Характерные рентгеносемиотические паттерны ремоделирования костной ткани и остеосклероза, жировой инволюции мягкотканного опухолевого субстрата на фоне лечения позволяют использовать КТ для динамического наблюдения при диффузно-очаговой, множественно-очаговой и солитарной формах ММ. Выбрав зону или зоны наибольшего поражения костей при выполнении низкодозовой КТ всего тела, дальнейшее наблюдение можно проводить по стандартным КТ или МРТ-протоколам. Отсутствие очагово-деструктивных изменений при первоначальном КТ-исследовании не может являться основанием для исключения специфического поражения костной ткани и требует дообследования пациента посредством МРТ.

#### Информация об авторах

**Костина Ирина Эдуардовна** (Kostina I. E.), врач-рентгенолог, кандидат медицинских наук, заведующая отделением рентгенологии и компьютерной томографии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; +7(495) 612-09-09, ikost@list.ru

**Гитис Михаил Кельманович** (Gitis M. K.), врач-рентгенолог отделения рентгенологии и компьютерной томографии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, mgitis@gmail.com

**Менделеева Лариса Павловна** (Mendeleeva L. P.), доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора по научной работе и инновациям, заведующая отделением высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, mendeleeva.l@blood.ru

**Баграмян Анастасия Юрьевна** (Bagratyan A. Yu.), врач-рентгенолог отделения рентгенологии и компьютерной томографии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, relaxi2005@yandex.ru

**Соловьев Максим Валерьевич** (Solovyev M. V.), врач-гематолог научно-клинического отделения высокодозной химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, maxsolovej@mail.ru

**Грибанова Елена Олеговна** (Gribanova E. O.), врач-гематолог, кандидат медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, el.gribanova@mail.ru

**Савченко Валерий Григорьевич** (Savchenko V. G.) академик РАН, профессор, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, director@blood.ru

#### Литература

1. Менделеева Л. П., Покровская О. С., Рехтина И. Г. Протокол диагностики и лечения множественной миеломы // В кн.: Савченко В. Г., ред. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. — М.: Практика, 2018; т. 2, 405 с.
4. Менделеева Л. П., Вотякова О. М., Покровская О. С. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы. Гематология и трансфузиология 2016; 61:1–24. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-1.

Остальные источники см. в References.

#### References

1. Mendeleeva L. P., Pokrovskaya O. S., Rekhina I. G. The protocol of diagnosis and treatment of multiple myeloma // In: V. G. Savchenko (ed.). Diagnostic algorithms and treatment protocols for hematological diseases. — М.: Praktika, 2018; 405 p. (In Russian).
2. Dimopoulos M., Terpos E., Comenzo R. L. et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23:1545–1556. doi: 10.1038/leu.2009.89.
3. Lutje S., de Rooy J., Croockewit S. et al. Role of radiography, MRI and FDG-PET/CT in diagnosing, staging and therapeutical evaluation of patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2009; 88:1161–1168. doi: 10.1007/s00277-009-0829-0.
4. Mendeleeva L. P., Votyakova O. M., Pokrovskaya O. S. et al. National clinical guidelines for diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Hematology and Transfusiology* 2016; 61:1–24 (in Russian). doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-1.
5. Ippolito D., Besostri V., Bonaffini P. A. et al. Diagnostic value of whole-body low-dose computed tomography (WBLDCT) in bone lesions detection in patients with multiple myeloma (MM). *Eur J Radiol* 2013; 82:2322–2327. doi: 10.1016/j.ejrad.2013.08.036.
6. Dimopoulos M. A., Hillengass J., Usmani S. et al. Role of magnetic resonance imaging in the management of patients with multiple myeloma: a consensus statement. *J Clin Oncol* 2015; 33:657–664. doi: 10.1200/JCO.2014.57.9961.
7. Regelink J. C., Minnema M. C., Terpos E. et al. Comparison of modern and conventional imaging techniques in establishing multiple myeloma-related bone disease: a systematic review. *Br J Haematol* 2013; 162:50–61. doi: 10.1111/bjh.12346.
8. Hillengass J., Mouloupoulos L. A., Delorme S. et al. Whole-body computed tomography versus conventional skeletal survey in patients with multiple myeloma: a study of the International Myeloma Working Group. *Blood Cancer J* 2017; 7:e599. doi: 10.1038/bcj.2017.78.
9. Terpos E., Kleber M., Engelhardt M. et al. European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications. *Haematologica* 2015; 100:1254–1266. doi: 10.3324/haematol.2014.117176.
10. Pianto M. J., Terpos E., Roodman G. D. et al. Whole-body low-dose computed tomography and advanced imaging techniques for multiple myeloma bone disease. *Clin Cancer Res* 2014; 20:5888–5897. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1692.
11. Lambert L., Ourednicek P., Meckova Z. et al. Whole-body low-dose computed tomography in multiple myeloma staging: Superior diagnostic performance in the detection of bone lesions, vertebral compression fractures, rib fractures and extraskelatal findings compared to radiography

- with similar radiation exposure. *Oncology Letters* 2017; 13:2490–2494. doi:10.3892/ol.2017.5723.
12. Zacchino M., Bonaffini P. A., Corso A. et al. Inter-observer agreement for the evaluation of bone involvement on Whole Body Low Dose Computed Tomography (WBLDCT) in Multiple Myeloma (MM). *Eur Radiol* 2015; 25:3382–3389. doi: 10.1007/s00330-015-3733-0.
13. Derlin T., Peldschus K., Munster S. et al. Comparative diagnostic performance of <sup>18</sup>F-FDG PET/CT versus whole-body MRI for determination of remission status in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Eur Radiol* 2013; 23:570–578. doi: 10.1007/s00330-012-2600-5.
14. Wolf M. B., Murray F., Kilk K. et al. Sensitivity of whole-body CT and MRI versus projection radiography in the detection of osteolyses in patients with monoclonal plasma cell disease. *Eur J Radiol* 2014; 83:1222–1230. doi: 10.1016/j.ejrad.2014.02.008.
15. Gleeson T. G., Moriarty J., Shortt C. P. et al. Accuracy of whole-body low-dose multidetector CT (WBLDCT) versus skeletal survey in the detection of myelomatous lesions, and correlation of disease distribution with whole-body MRI (WBMRI). *Skeletal Radiology* 2009; 38:225–236. doi: 10.1007/s00256-008-0607-4.
16. Hameed A., Foran P., Ryan J. et al. Imaging techniques used in multiple myeloma. *J Cancer & Allied Specialties* 2015; 1:2.
17. Healy C. F., Murray J. G., Eustace S. J. et al. Multiple myeloma: A review of imaging features and radiological techniques. *Bone Marrow Res* 2011, ID 583439, doi: 10.1155/2011/583439.
18. Tan E., Weiss B. M., Mena E. et al. Current and future imaging modalities for multiple myeloma and its precursor states. *Leuk Lymphoma* 2011; 52:1630–1640, doi: 10.3109/10428194.2011.573036.

# ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ И ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ КЛОНАЛЬНОСТИ В РАЗГРАНИЧЕНИИ ОПУХОЛЕВОЙ И РЕАКТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ БОЛЬШИХ ГРАНУЛЯРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Flow cytometry and PCR-based T-cell clonality testing for discriminating between reactive and neoplastic proliferation of large granular lymphocytes

Чернова Н. Г.<sup>1</sup>, Сидорова Ю. В.<sup>1</sup>, Захарько Е. И.<sup>1</sup>, Наумова Е. В.<sup>2</sup>, Рыжикова Н. В.<sup>1</sup>, Гальцева И. В.<sup>1</sup>, Дvirnyk В. Н.<sup>1</sup>, Смирнова С. Ю.<sup>1</sup>, Судариков А. Б.<sup>1</sup>, Кохно А. В.<sup>1</sup>, Моисеева Т. Н.<sup>1</sup>, Луговская С. А.<sup>2</sup>, Звонков Е. Е.<sup>1</sup>, Савченко В. Г.<sup>1</sup>

Chernova N. G.<sup>1</sup>, Sidorova Yu. V.<sup>1</sup>, Zakharko E. I.<sup>1</sup>, Naumova E. V.<sup>2</sup>, Ryzhikova N. V.<sup>1</sup>, Galtseva I. V.<sup>1</sup>, Dvirnyk V. N.<sup>1</sup>, Smirnova S. Yu.<sup>1</sup>, Sudarikov A. B.<sup>1</sup>, Kokhno A. V.<sup>1</sup>, Moiseeva T. N.<sup>1</sup>, Lugovskaya S. A.<sup>2</sup>, Zvonkov E. E.<sup>1</sup>, Savchenko V. G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>1</sup> National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Кафедра клинической лабораторной диагностики ФГБУЗ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Department of clinical laboratory diagnostics, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Пролиферация больших гранулярных лимфоцитов (БГЛ) может быть ассоциирована с вирусной инфекцией, аутоиммунными заболеваниями или быть проявлением хронического лимфопролиферативного заболевания НК-клеток (ХЛПЗ-НК) и Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ). Дифференциальная диагностика пролиферации БГЛ до сих пор представляет определенные трудности.

**Цель:** оценить значение иммунофенотипирования методами проточной цитометрии и ПЦР-исследования Т-клеточной клональности в разграничении реактивной и опухолевой пролиферации БГЛ.

**Материалы и методы.** Проведен анализ основных клинико-лабораторных показателей у 68 пациентов с БГЛ-лимфоцитозом (20 мужчин и 48 женщин) в возрасте от 22 до 79 лет (медиана возраста 53 года). Всем больным было выполнено цитологическое исследование мазка периферической крови, иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии, исследование Т-клеточной кло-

## ABSTRACT

**Background.** Proliferation of large granular lymphocytes (LGL) can be associated with viral infections, autoimmune disorders, chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells (CLPD-NK), or T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL). Differential diagnosis between reactive and neoplastic LGL proliferation could be a challenge.

**Objective.** To evaluate the role of morphological, immunophenotypic (flow cytometry) and molecular genetic (PCR-based T-cell clonality) studies in differential diagnosis of LGL proliferation.

**Materials and methods.** 68 patients with increased peripheral blood LGL counts were enrolled in the study. Male/female ratio was 20/48; the median age was 53 (22–79) years. Blood smear, immunophenotyping by flow cytometry, and PCR-based T-cell clonality assays (TCRG (V $\gamma$ -J $\gamma$ ) and TCRG (D $\beta$ -J $\beta$  and V $\beta$ -J $\beta$ )) were performed in all cases.

**Results.** We found that morphology, immunophenotype, relative and absolute LGL counts, or heterogenic expression of T-cell markers can not distinguish between

нальности методом ПЦР по реаранжировкам генов  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепей Т-клеточного рецептора.

**Результаты.** В результате исследования было показано, что морфологические и иммунофенотипические признаки, относительный и абсолютный лимфоцитоз, гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров не позволяют разграничить опухолевую и реактивную пролиферацию БГЛ. Наиболее специфичным для разграничения реактивного и опухолевого БГЛ-лимфоцитоза оказалось одновременное выявление моноклональности по *TCRG (V $\gamma$ -J $\gamma$ )* и *TCRG (V $\beta$ -J $\beta$ )* локусам или выявление полной реаранжировки *TCRG (V $\beta$ -J $\beta$ )*.

**Ключевые слова:** большие гранулярные лимфоциты, хроническое лимфопролиферативное заболевание НК-клеток, Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов, проточная цитометрия, ПЦР-исследование Т-клеточной клональности, клональные реаранжировки

**Для цитирования:** Чернова Н. Г., Сидорова Ю. В., Захарько Е. И., Наумова Е. В., Рыжикова Н. В., Гальцева И. В., Двирнык В. Н., Смирнова С. Ю., Судариков А. Б., Кохно А. В., Моисеева Т. Н., Луговская С. А., Звонков Е. Е., Савченко В. Г. Проточная цитометрия и ПЦР-исследование Т-клеточной клональности в разграничении опухолевой и реактивной пролиферации больших гранулярных лимфоцитов. *Гематология и трансфузиология*. 2018; 63(2):124–133 doi: 10.25837/HAT.2018.48..2..003

**Для корреспонденции:** Чернова Наталья Геннадьевна, к. м. н., врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с круглосуточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 126167, г. Москва, Россия E-mail: ngchernova@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.03.18

Принята к печати 15.10.2018

neoplastic and reactive LGL proliferation. Clonal *TCRG (V $\gamma$ -J $\gamma$ )* and *TCRG (D $\beta$ -J $\beta$ )* gene rearrangements were observed in reactive LGL lymphocytes and T-LGL. Complete rearrangements of *TCRG (V $\beta$ -J $\beta$ )* genes were specific for malignancies and were not detected in any case of reactive lymphocytosis.

**Keywords:** large granular lymphocytes, chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells, T-cell large granular lymphocytic leukemia, flow cytometry, PCR-based T-cell clonality testing, reactive lymphocytosis

**For citation:** Chernova N. G., Sidorova Yu. V., Zakharko E. I., Naumova E. V., Ryzhikova N. V., Galtseva I. V., Dvirnyk V. N., Smirnova S. Yu., Sudarikov A. B., Kokhno A. V., Moiseeva T. N., Lugovskaya S. A., Zvonkov E. E., Savchenko V. G. *Flow cytometry and PCR-based T-cell clonality testing for discriminating between reactive and neoplastic proliferation of large granular lymphocytes*. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2018; 63(2):124–133 (in Russian) doi: 10.25837/HAT.2018.48..2..003

**For correspondence:** Chernova Natalia, MD, PhD, hematologist in National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: ngchernova@mail.ru

**Information about authors:**

Chernova N. G., <http://orcid.org/0000-0002-0827-4052>;  
Sidorova Yu. V., <http://orcid.org/0000-0003-1936-0084>;  
Zakharko E. I., <https://orcid.org/0000-0002-1884-352X>;  
Naumova E. V., <http://orcid.org/0000-0002-6048-5746>;  
Ryzhikova N. V., <http://orcid.org/0000-0003-2424-9524>;  
Galtseva I. V., <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>;  
Dvirnyk V. N., <http://orcid.org/0000-0002-9877-0796>;  
Smirnova S. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-6220-8868>;  
Sudarikov A. B., <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>;  
Kokhno A. V., <http://orcid.org/0000-0003-0261-5941>;  
Moiseeva T. N., <https://orcid.org/0000-0001-9591-8508>;  
Lugovskaya S. A., <http://orcid.org/0000-0002-6405-3422>;  
Zvonkov E. E., <http://orcid.org/0000-0002-2639-7419>;  
Savchenko V. G., <https://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 19 Mar 2018

Accepted 15 Oct 2018

## Введение

Термин «Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов» ввел Т. Loughran в 1993 г. для описания клональной пролиферации зрелых посттимических клеток [1]. Большие гранулярные лимфоциты (БГЛ) — это антигенпримированные цитотоксические Т-, НКТ-лимфоциты и НК-клетки [2]. В норме у взрослого человека БГЛ составляют 10–15% общего числа мононуклеарных клеток периферической крови [3]. Большинство БГЛ представлено  $CD3^-$  НК-клетками, и

лишь около 15% составляют  $CD3^+$  цитотоксические Т- и НКТ-лимфоциты. Клональная пролиферация  $CD3^-/CD56^+$ -клеток в классификации ВОЗ (2017) обозначена термином «хроническое лимфопролиферативное заболевание НК-клеток» (ХЛПЗ-НК), а  $CD3^+/CD8^+$ -клеток — термином «Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов» (Т-ЛБГЛ). Клональная пролиферация цитотоксических Т-лимфоцитов составляет около 85% всех случаев БГЛ-лимфопролиферации [4].

Т-ЛБГЛ диагностируют преимущественно в возрасте 55–60 лет [5, 6]. В литературе не отмечено значительных различий в заболеваемости мужчин и женщин или в географическом распространении болезни. Этиология Т-ЛБГЛ до конца не известна, однако отмечена четкая связь с аутоиммунными заболеваниями. У 30% больных наблюдается сочетание Т-ЛБГЛ с ревматоидным артритом, при других ревматологических заболеваниях Т-ЛБГЛ встречается значительно реже [7–9]. При Т-ЛБГЛ в гемограмме наблюдается относительный и/или абсолютный БГЛ-лимфоцитоз. При цитологическом исследовании мазка периферической крови опухолевые БГЛ не отличаются от нормальных: лимфоциты средних или крупных размеров с эксцентрично расположенным ядром, умеренно конденсированным хроматином, обильной слабо базофильной цитоплазмой, грубыми и/или нежными азурофильными гранулами [4]. Общее количество лейкоцитов может быть нормальным или слегка повышенным, у 85% больных наблюдается гранулоцитопения (количество гранулоцитов не превышает  $0,5 \times 10^9/\text{л}$ ), у 50% — анемия, у 20% — тромбоцитопения [4].

Опухолевые лимфоциты при Т-ЛБГЛ, как и их нормальные аналоги, имеют зрелый цитотоксический Т-клеточный иммунофенотип и экспрессируют поверхностные маркеры CD3, CD8, CD2, CD16, CD56, CD57 [4]. В отличие от нормальных БГЛ, на опухолевых клетках наблюдается снижение и/или отсутствие и/или гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров, в частности CD2, CD5, CD7 [10]. По наличию Т-клеточных маркеров CD3, CD4 и CD8 на поверхности опухолевых клеток выделяют 4 иммунофенотипических варианта: CD8-позитивный (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), CD4-позитивный (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), дубль-позитивный (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), дубль-негативный (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) [3, 11, 12]. В зависимости от типа Т-клеточного рецептора (TCR) выделяют два варианта Т-ЛБГЛ:  $\gamma\delta$  и  $\alpha\beta$ . В большинстве случаев Т-ЛБГЛ имеется реаранжировка генов  $\beta$ -цепи TCR (*TCRB*), в редких случаях *TCRB* остается в герминальной конфигурации, и имеется реаранжировка только  $\gamma$ -цепи TCR (*TCRG*) [13].

Диагноз Т-ЛБГЛ устанавливают на основании повышения в периферической крови показателей БГЛ с характерной морфологией и иммунофенотипом выше  $2 \times 10^9/\text{л}$  в течение более чем 6 мес без какой-либо причины [4, 11]. Однако на сегодняшний день нет единого мнения относительно того, какие значения БГЛ-лимфоцитоза достаточны для верификации диагноза Т-ЛБГЛ [11]. Считается, что реактивный БГЛ-лимфоцитоз не должен превышать  $0,5 \times 10^9/\text{л}$ , а для Т-ЛБГЛ характерно большее количество БГЛ. Если количество БГЛ в периферической крови превышает  $2,0 \times 10^9/\text{л}$ , диагноз Т-ЛБГЛ не вызывает сомнений [4].

В этой статье представлен собственный опыт дифференциальной диагностики БГЛ-лимфоцитоза, иммунофенотипические и молекулярные аспекты верификации Т-ЛБГЛ и реактивного лимфоцитоза.

Цель работы — оценить значение иммунофенотипирования методом проточной цитометрии и ПЦР-исследования Т-клеточной клональности в разграничении реактивной и опухолевой пролиферации БГЛ.

## Материалы и методы

Проведен анализ основных клинико-лабораторных показателей у 68 пациентов с БГЛ-лимфоцитозом (20 мужчин и 48 женщин) в возрасте от 22 до 79 лет (медиана возраста 53 года), обратившихся в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России с 2010 по 2017 год.

Всем больным было выполнено цитологическое исследование мазка периферической крови, иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии, исследование Т-клеточной клональности методом ПЦР по реаранжировкам генов  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепей Т-клеточного рецептора. БГЛ-лимфоцитоз верифицировался при выявлении в лейкоцитарной формуле увеличенного количества БГЛ (более 10–15% мононуклеарных клеток или более 5% всех лейкоцитов) при наличии относительного и/или абсолютного лимфоцитоза по данным клинического анализа крови и иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии. Комплексное клинико-лабораторное обследование, в том числе исследование пунктата костного мозга, проводили при подозрении на Т-ЛБГЛ, ХЛПЗ-НК или другие заболевания кроветворной системы.

Имунофенотипическое исследование образцов периферической крови и костного мозга выполняли методом многоцветной проточной цитометрии на FACS Canto II (Becton Dickinson, США) или проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) с использованием реагентов производства Becton Dickinson, BeckmanCoulter и Dako. Диагностические панели включали CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD45, CD56, CD57, TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ .

Оценку Т-клеточной клональности проводили по реаранжировкам генов  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепей TCR ( $V\gamma$ - $J\gamma$  и  $V\beta$ - $J\beta$ ,  $D\beta$ - $J\beta$ ). Для этого использовали метод мультиплексной ПЦР по протоколу BIOMED-2 [14] и последующий фрагментный анализ на секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Флюоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) оценивали при помощи компьютерной программы GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США).

## Результаты

На основании проведенного обследования пациентов с БГЛ-лимфоцитозом было выделено три группы: 1-я группа (n = 8) — хроническое ХЛПЗ-НК; 2-я группа (n = 42) — Т-ЛБГЛ; 3-я группа (n = 17) — реактивный БГЛ-лимфоцитоз. У 1 больного наблюдалось развитие лимфомы Ходжкина на фоне Т-ЛБГЛ.

Среди 8 больных ХЛПЗ-НК было 5 мужчин и 3 женщины, медиана возраста — 55,5 (37–69) года (табл. 1) Средние показатели лейкоцитов были  $10,3 (2,7–18,6) \times 10^9/\text{л}$ , нейтрофилов —  $2,78 (1,03–5,72) \times 10^9/\text{л}$ , лимфоцитов —  $6,8 (1,4–13,3) \times 10^9/\text{л}$ , гемоглобина — 135 (86–160) г/л, тромбоцитов —  $282 (161–383) \times 10^9/\text{л}$ . Среднее содержание лимфо-

цитов составило 63 (50–79)%, нейтрофилов — 29 (19–40)%.

В большинстве случаев размер селезенки оставался в пределах нормы, и только у 1 больного продольный размер превышал 12 см.

При иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови была выявлена лимфоидная популяция

**Таблица 1.** Клинико-лабораторная характеристика пациентов с БГЛ-лимфоцитозом

**Table 1.** Clinico-laboratory characteristics of patients with LGL lymphocytosis

Параметр Parameter	ХЛПЗ-НК, n = 8 CLPD-NK, n = 8	Т-ЛБГЛ, n = 42 T-LGL, n = 42	Реактивный БГЛ-лимфоцитоз, n = 17 Reactive LGL lymphocytosis, n = 17
Соотношение м/ж Ratio m/f	5/3	9/33	5/12
Медиана возраста Median age	55,5 (37–69)	57 (29–79)	48 (22–77)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Leukocytes, $\times 10^9/\text{l}$	10,3 (2,7–18,6)	8,8 (1,8–51,1)	5,4 (1,2–10,7)
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	135 (86–160)	111 (66–160)	119 (53–161)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{l}$	282 (161–383)	217 (19–459)	217 (6–342)
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Neutrophils, $\times 10^9/\text{l}$	2,8 (1,03–5,72)	1,5 (0–8,5)	1,9 (0–8,5)
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	29 (19–40)	19 (1–55)	32 (3–49)
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Lymphocytes, $\times 10^9/\text{l}$	6,8 (1,4–13,3)	6,8 (1,2–49,1)	2,4 (1,2–7)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	63 (50–79)	73 (38–96)	60,5 (45–96)
Гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров Heterogeneity of expression of T-cell markers	<b>2 из 8</b> 2 of 8	<b>34 (85%) из 40</b> 34 (85%) of 40	<b>8 (47,1%) из 17</b> 8 (47,1%) of 17

**Таблица 2.** ПЦР-исследование Т-клеточной клональности у пациентов с ХЛПЗ-НК, Т-ЛБГЛ и реактивным БГЛ-лимфоцитозом

**Table 2.** PCR studies of T-cell clonality in patients with CLPD-NK, T-LGL and reactive LGL lymphocytosis

Варианты БГЛ-лимфоцитоза Variants of LGL lymphocytosis	n	TCRG ( $V\gamma-J\gamma$ )	TCRB ( $D\beta-J\beta$ )	TCRB ( $V\beta-J\beta$ )	TCRB ( $D\beta-J\beta$ и/или $V\beta-J\beta$ ) TCRB ( $D\beta-J\beta$ and/or $V\beta-J\beta$ )
ХЛПЗ-НК CLPD-NK	8	0	0	0	0
Т-ЛБГЛ T-LGL	42	36 (85,7%)	22 (52,4%)	33 (78,6%)	37 (88,1%)
TCR $\alpha\beta$ -вариант Т-ЛБГЛ TCR $\alpha\beta$ -positive T-LGL	30	25 (83,3%)	17 (56,7%)	29 (96,7%)	30 (100%)
TCR $\gamma\delta$ -вариант Т-ЛБГЛ TCR $\gamma\delta$ -positive T-LGL	12	11 (91,7%)	5 (41,7%)	4 (33,3%)	7 (58,3%)
Реактивный БГЛ-лимфоцитоз Reactive LGL lymphocytosis	17	3 (17,6%)	1 (5,9%)	0	1 (5,9%)

с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>±</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>±</sup>, гетерогенность экспрессии маркера CD7 наблюдалась у 2 больных. Среднее содержание NK-клеток составило 60,9 (26,6–89,7)% общего количества лимфоцитов, среднее абсолютное содержание — 4,091 (0,805–7,740) × 10<sup>9</sup>/л. При исследовании Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов γ- и β-цепей TCR (Vγ-Jγ и Vβ-Jβ, Dβ-Jβ) ни у кого не выявлено клональных перестроек генов цепей Т-клеточного рецептора (табл. 2).

Диагноз Т-ЛБГЛ был установлен у 42 больных (9 мужчин и 33 женщин) в возрасте от 29 до 79 лет (медиана возраста 57 лет) (см. табл. 1), во всех случаях БГЛ-лимфоцитоз сохранялся более 6 мес без какой-либо известной причины. Увеличение продольного размера селезенки более 12 см наблюдалось у 17 (40,5%) из 42 больных.

Средние показатели гемоглобина — 111 (66–160) г/л, лейкоцитов — 8,8 (1,8–51,1) × 10<sup>9</sup>/л, тромбоцитов — 217 (19–459) × 10<sup>9</sup>/л, нейтрофилов — 1,46 (0–8,5) × 10<sup>9</sup>/л, лимфоцитов — 6,8 (1,2–49,1) × 10<sup>9</sup>/л; содержание лимфоцитов — 73 (38–96)%, нейтрофилов — 19 (1–55)%.

Показания к началу иммуносупрессивной терапии (снижение гемоглобина менее 100 г/л, и/или гранулоцитопения менее 0,5 × 10<sup>9</sup>/л, и/или тромбоцитопения менее 50 × 10<sup>9</sup>/л) были отмечены у 20 (47,6%) из 42 больных.

При иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови αβ-вариант Т-ЛБГЛ был установлен у 30 (71,4%) из 42 больных, γδ-вариант — у 12 (28,6%). Были выделены следующие варианты иммунофенотипа: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> — у 13 (43,4%), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> с экспрессией CD16 и/или CD56 — у 9 (30%), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> с вариабельной экспрессией CD16 и CD56 — у 4 (13,3%), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> с вариабельной экспрессией CD16 и CD56 — у 4 (13,3%) из 30 больных αβ-вариантом Т-ЛБГЛ. У 12 больных γδ-вариантом Т-ЛБГЛ опухолевые клетки характеризовались CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-иммунофенотипом, экспрессия маркеров CD8, CD16, CD56 была вариабельной. Дубль-негативный вариант (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) Т-ЛБГЛ был определен у 5 больных. Относительные и абсолютные показатели опухолевой БГЛ-популяции представлены в табл. 3.

**Таблица 3.** Средние относительные и абсолютные показатели опухолевой популяции при Т-ЛБГЛ  
**Table 3.** The mean relative and absolute values of the tumor population with T-LGL (flow cytometry)

Варианты иммунофенотипа Т-ЛБГЛ <i>Variants of immunophenotype T-LGL</i>		n	Средние относительные и абсолютные показатели опухолевой БГЛ-популяции в ПК (данные ПЦ) <i>The mean relative and absolute values of the tumor population with T-LGL in PB (flow cytometry)</i>		Референсные значения* Т-лимфоцитов с соответствующим иммунофенотипом в ПК <i>The reference values* of T-lymphocytes with the corresponding immunophenotype (flow cytometry)</i>	
			%	× 10 <sup>9</sup> /л × 10 <sup>9</sup> /l	%	× 10 <sup>9</sup> /л × 10 <sup>9</sup> /l
α β	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	13	63,5 (33,4–85,2)	4,4 (0,2–28,5)	19–27	0,3–0,8
	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> и/или CD56 <sup>+</sup> <i>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> and/or CD56<sup>+</sup></i>	9	69,2 (17,2–86,5)	4,0 (0,22–8)	0,5–6	0,007–0,165
	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> с вариабельной экспрессией CD16 и CD56 <i>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> with variable expression CD16 and CD56</i>	4	90,3 (82,3–98)	15,5 (2,8–35,9)	33–55	0,576–1,336
	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> с вариабельной экспрессией CD16 и CD56 <i>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> with variable expression CD16 and CD56</i>	4	38,7 (14–65,5)	1,9 (0,4–3,4)	0–3	—
γ δ	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>±</sup> CD16 <sup>±</sup> CD56 <sup>±</sup>	12	57,1 (22,9–88,1)	3,9 (0,4–18,2)	1,8–7,4	0,22–0,115

ПК — периферическая кровь, ПЦ — проточная цитометрия, \* — референсные значения относительного и абсолютного количества основных популяций Т-лимфоцитов в ПК представлены в работе Хайдукова С. В. и Байдун Л. В. [15].

PB — peripheral blood, \* — reference values of the relative and absolute number of subpopulations of T-lymphocytes in the PB are presented in the work of S. V. Khaydukov and L. V. Baidun [15].

**Таблица 4.** Характеристики больных с реактивным БГЛ-лимфоцитозом  
**Table 4.** Characteristics of patients with reactive LGL lymphocytosis

Пол/ Возраст Gender/ age	Заблевание, сопровождается реактивным БГЛ-лимфоцитозом Disease accompanied by reactive LGL lymphocytosis	Срок разрешения БГЛ-лимфоцитоза, мес The term of resolution of LGL lymphocytosis, mos	ИФТ Immunophenotype	Гетерогенность экспрессии Т-клеточ- ных маркеров Heterogeneity of expression of T-cell markers	TCRG (Vγ-γ)	TCRV (Dβ-β)	TCRV (Vβ-β)	TCRV (Dβ-β и/или Vβ-β) TCRV (Dβ-β and/or Vβ-β)
ж/22 f/22	нет no	4	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
ж/48 f/48	нет no	6	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
ж/46 f/46	нет no	5	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
м/31 m/31	нет no	7	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	нет no	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
ж/39 f/39	нет no	8	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> & CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD2, CD5, CD7	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
ж/52 f/52	нет no	3	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	CD5, CD7	СОМН dub	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	МОНО mono
ж/52 f/52	нет no	4	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
ж/63 f/63	нет no	5	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	ПОЛИ poly	СОМН dub	ПОЛИ poly	СОМН dub
ж/57 f/57	нет no	5	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3, CD5, CD7	СОМН dub	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
м/26 m/26	через 7 лет после алло-ТКМ по поводу рецидива АККЛ, ALK <sup>+</sup> 7 years after allo-HSCT for recurrence of ALCL, ALK <sup>+</sup>	4	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	СОМН dub	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
ж/66 f/66	через 1,5 мес после лечебно- диагностической спленэктомии (ДВККЛ селезенки, богатая гистиоцитами) 1,5 months after the treatment-diagnostic splenectomy (THRLBCL of spleen)	8	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	CD2, CD5, CD7	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly
м/24 m/24	Дебют экстранодальной НК/Т-лимфомы, назальный тип Extranodal NK/T-lymphoma, nasal type	2	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD5, CD7	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly	ПОЛИ poly

**Таблица 4 (окончание).** Характеристика больных с реактивным БГЛ-лимфоцитозом  
**Table 4.** Characteristics of patients with reactive LGL lymphocytosis

Пол/ Возраст Gender/ age	Заболевание, сопровождающееся реактивным БГЛ-лимфоцитозом Disease accompanied by reactive LGL lymphocytosis	Срок разрешения БГЛ-лимфоцитоза, мес The term of resolution of LGL lymphocytosis, mos	ИФТ Immunofenotип	Гетерогенность экспрессии Т-клеточ- ных маркеров Heterogeneity of expression of T-cell markers	TCRG (Vγ-Jγ)	TCRB (Dβ-Jβ)	TCRB (Vβ-Jβ)	TCRB (Dβ-Jβ) и/или Vβ-Jβ TCRB (Dβ-Jβ and/or Vβ-Jβ)
ж/77 f/77	дебют МДС, РАИБ-1 MDS	3	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	моно mono	поли poly	поли poly	поли poly
ж/61 f/61	дебют МДС, РАИБ-1 MDS	2	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup>	нет no	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
м/48 m/48	дебют МДС, РАИБ-2 MDS	4	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD5, CD8	моно mono	поли poly	поли poly	поли poly
м/60 m/60	дебют МДС, РАИБ-2 MDS	6	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3, CD5, CD7, CD8	сомн dub	поли poly	поли poly	поли poly
ж/45 f/45	дебют МДС, РАИБ-2 MDS	3	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	нет no	моно mono	поли poly	сомн dub	сомн dub

МДС — миелодиспластический синдром, ДВКЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома, АКЛ, ALK<sup>+</sup> — анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-позитивная, алло-ТКМ — трансплантация аллогенного костного мозга, ИФТ — иммунофенотип, РАИБ — рефрактерная анемия с избытком blasts, моно — моноклональная картина, поли — поликлональная картина, сомн — сомнительный пик.  
MDS — myelodysplastic syndrome, ThRLBCL — T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma, ALCL, ALK<sup>+</sup> — anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive, allo-HSCT — allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, mono — monoclonal case, poly — polyclonal case, dub — dubious peak.

Гетерогенность экспрессии хотя бы одного из Т-клеточных маркеров CD2, CD5, CD7 была отмечена в 34 (85%) из 40 оцененных случаев.

При исследовании Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов γ- и β-цепей TCR (Vγ-Jγ и Vβ-Jβ, Dβ-Jβ) в 41 (97,6%) из 42 случаев были выявлены перестройки генов либо *TCRG*, либо *TCRB*, лишь в одном случае γδ-варианта Т-ЛБГЛ наблюдались реаранжировки генов только δ-цепи TCR (см. табл. 2).

У 17 больных БГЛ-лимфоцитоз имел реактивный характер, со временем относительные и/или абсолютные показатели БГЛ нормализовались. Соотношение мужчин и женщин — 5/12, медиана возраста — 48 (22–77) лет (см. табл. 1).

Среднее содержание лейкоцитов было 5,4 (1,2–10,7) × 10<sup>9</sup>/л, нейтрофилов — 1,9 (0–8,5) × 10<sup>9</sup>/л, лимфоцитов — 2,4 (1,2–7,0) × 10<sup>9</sup>/л, гемоглобина — 119 (53–161) г/л, тромбоцитов — 217 (6–342) × 10<sup>9</sup>/л. Среднее процентное содержание лимфоцитов составило 60,5 (45–96)%, нейтрофилов — 31,8 (3–49)%.

В 11 из 17 случаев реактивный БГЛ-лимфоцитоз был представлен популяцией цитотоксических лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>), в 7 — НКТ-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> с экспрессией CD16 и/или CD56), причем у одной больной был отмечен реактивный БГЛ-лимфоцитоз за счет обеих популяций. В 8 (47,1%) из 17 случаев наблюдалась гетерогенность экспрессии хотя бы одного Т-клеточного маркера (CD2, CD3, CD5, CD7, CD8). В 5 из 17 случаев повышение относительного и абсолютного содержания БГЛ-лимфоцитов было значимым и превышало верхнюю границу нормы более чем в 2 раза.

При исследовании Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов *TCRG* (Vγ-Jγ) и *TCRB* (Vβ-Jβ, Dβ-Jβ) перестройки генов γ-цепи Т-клеточного рецептора были выявлены в 3 случаях, еще в 5 случаях результат носил сомнительный характер. Неполная реаранжировка генов *TCRB* (Dβ-Jβ) была определена только в одном случае, тогда как ни в одном случае реактивного БГЛ-лимфоцитоза не было выявлено полной реаранжировки генов *TCRB* (Vβ-Jβ) (см. табл. 2).

Интересно, что у 7 из 17 больных этой группы реактивный БГЛ-лимфоцитоз был выявлен на фоне опухолевых заболеваний кроветворной системы (табл. 4).

Проведенное комплексное обследование, включающее морфологическое, цитогенетическое и молекулярное исследования костного мозга, позволило верифицировать диагноз. Различия иммунофенотипических маркеров опухолевых клеток и реактивных цитотоксических НКТ-лимфоцитов позволили исключить лейкемизацию опухолевого процесса у больной экстранодальной НК/Т-лимфомой. У больной В-крупноклеточной лимфомой селезенки, богатой гистиоцитами, реактивный БГЛ-лимфоцитоз наблюдался через полтора месяца после спленэктомии. В гемограмме количество лейкоцитов было 8,3 × 10<sup>9</sup>/л,

лимфоцитоз до 70%, причем 59% лимфоцитов содержали крупные азурофильные гранулы. Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови выявило увеличение абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>) с гетерогенностью экспрессии маркеров CD2, CD5 и CD7; В-лимфоциты были поликлональны. Молекулярное исследование образца периферической крови не выявило реаранжировок генов *TCRG* и *TCRB*. После завершения терапии по поводу В-клеточной лимфомы селезенки при повторном цитологическом и иммунофенотипическом исследованиях лимфоцитов периферической крови (через 8 мес) было отмечено уменьшение лейкоцитоза до  $4,9 \times 10^9/\text{л}$ , процентного содержания лимфоцитов — до 46% и БГЛ — до 28%. У остальных 5 больных при дополнительном обследовании был верифицирован диагноз миелодиспластического синдрома. Морфологическое исследование костного мозга выявило признаки дисмиелопоэза, в миелограмме отмечено увеличение количества бластных клеток. При иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови в 2 из 5 случаев было выявлено преобладание популяции цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>), в 3 случаях — НКТ-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> с экспрессией CD16 и/или CD56) с гетерогенной экспрессией Т-клеточных маркеров CD2, CD3, CD5, CD7 и CD8. При молекулярном исследовании образцов периферической крови у 3 из 5 больных с реактивным БГЛ-лимфоцитозом на фоне миелодиспластического синдрома была выявлена Т-клеточная клональность по перестройкам генов *TCRG*, тогда как перестройки генов *TCRB* не были обнаружены ни в одном из случаев. У одного больного наблюдали развитие лимфомы Ходжкина на фоне CD4<sup>-</sup>позитивной Т-клеточной лимфопролиферации, протекающей с аплазией кроветворения. Т-ЛБГЛ дебютировал с анемии (Hb 54 г/л), тромбоцитопении менее  $50 \times 10^9/\text{л}$  и лейкопении менее  $2,4 \times 10^9/\text{л}$ . В лейкоцитарной формуле был отмечен лимфоцитоз 92%. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови выявило CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>TCRαβ<sup>+</sup>-популяцию лимфоидных клеток. При молекулярном исследовании Т-клеточной клональности в образцах крови и костного мозга были определены перестройки генов *TCRG* и *TCRB*. Больному была начата иммуносупрессивная терапия циклоспорином. Через 9 мес с момента манифестации заболевания было обнаружено увеличение размеров печени и селезенки, периферических и висцеральных лимфатических узлов. Размер конгломерата медиастинальных лимфатических узлов составлял 69 × 24 мм. При гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях биоптата внутригрудного лимфатического узла был верифицирован диагноз лимфомы Ходжкина, ассоциированной с вирусом Эпштейна—Барр. При молекулярном исследовании Т-клеточной клональности

в биоптатах селезенки и лимфатического узла были выявлены те же клональные продукты, что в образцах крови и костного мозга.

## Обсуждение

На большом клиническом материале представлен опыт дифференциальной диагностики БГЛ-лимфоцитоза. Было продемонстрировано, что БГЛ-лимфоцитоз может быть проявлением ХЛПЗ-НК, Т-ЛБГЛ и реактивного процесса.

Т-ЛБГЛ развивается в результате накопления онкогенных мутаций в реактивных БГЛ [16]. Поликлональный иммунный ответ, сопровождающийся хронической антигенной стимуляцией цитотоксических Т-лимфоцитов на эндогенный или экзогенный антиген, служит первоначальным стимулом к экспансии одного из клонов БГЛ [17, 18]. Моноклональный БГЛ-лимфоцитоз на первых этапах протекает индолентно, но в дальнейшем в 60—70% случаев сменяется агрессивным клиническим течением с развитием цитопенического синдрома и связанных с ним осложнений [19].

Верификация Т-ЛБГЛ и дифференциальная диагностика БГЛ-лимфоцитоза представляет определенные трудности. В настоящее время не выявлены патогномоничные хромосомные аномалии, характерные иммунофенотипические маркеры и отличительные морфологические признаки, обнаружение которых позволяет безошибочно установить диагноз Т-ЛБГЛ.

Морфологическое и иммунофенотипическое исследования со стандартной панелью моноклональных антител позволяют лишь констатировать факт относительного и/или абсолютного БГЛ-лимфоцитоза, который имеет опосредованное значение. В ряде случаев реактивного БГЛ-лимфоцитоза мы наблюдали значительное увеличение популяции цитотоксических лимфоцитов. В то же время при Т-ЛБГЛ, протекающем с лейкопенией, выявляли относительный БГЛ-лимфоцитоз при абсолютной лимфопении. Относительное и абсолютное количества опухолевых БГЛ различались в зависимости от варианта иммунофенотипа, однако небольшое число случаев с CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> не позволило нам провести статистический анализ. Гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров не является патогномоничным признаком опухолевого процесса [10]. В нашем исследовании наблюдалась гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров (CD2, CD5, CD7, CD8) при ХЛПЗ-НК, реактивном БГЛ-лимфоцитозе и Т-ЛБГЛ, хотя, несомненно, снижение или отсутствие экспрессии Т-клеточных маркеров при Т-ЛБГЛ встречалось с большей частотой. Моноклональность Т-лимфоцитов по перестройкам генов *TCRG* также не является однозначным доказательством опухолевого процесса [20, 21]. При нормальном иммунном ответе на инфекционный агент или на опухолевый процесс

при аутоиммунных процессах может появляться моноклональная популяция цитотоксических лимфоцитов. Например, при инфекционном мононуклеозе у 40% пациентов выявляется моноклональная популяция лимфоцитов [22]. При аутоиммунной гемолитической анемии до 50% пациентов имеют моноклональную картину реаранжировок генов *TCRG* популяция лимфоцитов [22]. При аутоиммунной гемолитической анемии до 50% пациентов имеют моноклональную картину реаранжировок генов *TCRG* и клональную экспансию CD8<sup>+</sup> лимфоцитов [23]. Выявление Т-клеточной клональности лимфоцитов возможно при выраженной реакции «трансплантат против хозяина» [24]. В то же время описаны редкие случаи развития Т-ЛБГЛ после аутологичной и аллогенной трансплантации [25, 26], которые должны быть отграничены от олигоклональных Т-клеточных популяций, часто наблюдаемых у реципиентов гемопоэтических клеток [24]. Клональная популяция Т-лимфоцитов может определяться даже у здоровых доноров без признаков каких-либо заболеваний [27].

Моноклональный реактивный БГЛ-лимфоцитоз может наблюдаться при опухолевых процессах и маскировать основное заболевание. Например, в исследуемой нами группе больных среди 17 случаев реактивного цитотоксического лимфоцитоза у 7 пациентов были выявлены другие опухолевые гематологические заболевания.

При анализе реаранжировок генов *TCRG* и *TCRB* в образцах периферической крови мы получили интересные данные. Оказалось, что наиболее специфичными маркерами для разграничения Т-ЛБГЛ и реактивного БГЛ-лимфоцитоза является одновременное выявление моноклональности по *TCRG* и *TCRB*-локусам или выявление полной моноклональной реаранжировки гена *TCRB* (Vβ-Jβ). Эти события не были выявлены ни в одном из случаев реактивного цитотоксического лимфоцитоза.

Отсутствие опухолевых и ревматических заболеваний, клинически значимой вирусной инфекции, В-симптомов, снижения концентрации гемоглобина, числа тромбоцитов и гранулоцитов позволяет проводить динамическое наблюдение за больным с БГЛ-лимфоцитозом. Лечение Т-ЛБГЛ назначается только при наличии строгих показаний. По данным литературы, при диагностике заболевания две трети больных не нуждаются в лечении [12, 18].

Таким образом, выявление БГЛ-лимфоцитоза в периферической крови не дает оснований для верификации Т-ЛБГЛ, а лишь служит поводом для полного обследования с целью исключения заболеваний и состояний, которые могут сопровождаться пролиферацией БГЛ.

На большом клиническом материале была продемонстрирована дифференциальная диагностика БГЛ-лимфоцитоза, представлены иммунофенотипические и молекулярные аспекты разграничения опухолевой и реактивной пролиферации больших гранулярных лимфоцитов.

## Информация об авторах

**Чернова Наталья Геннадьевна** (Chernova N. G.), к. м. н., врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с круглосуточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ngchernova@mail.ru

**Сидорова Юлия Владимировна** (Sidorova Y. V.), к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, iouliavl@rambler.ru

**Захарько Екатерина Игоревна** (Zakharko E. I.), врач централизованной клинико-диагностической лаборатории, руководитель группы проточной цитометрии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, flowlabgnc@gmail.com

**Наумова Елена Владимировна** (Naumova E. V.), к. м. н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБУЗ ДПО РМАНПО МЗ РФ, e\_naum@mail.ru

**Рыжикова Наталья Валерьевна** (Ryzhikova N. V.), научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, nataly25-76@mail.ru

**Гальцева Ирина Владимировна** (Galtseva I. V.), к. м. н., заведующая научно-клинической лабораторией иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, irag@blood.ru

**Двирнык Валентина Николаевна** (Dvirnyk V. N.), к. м. н., заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, vdvirnyk@mail.ru

**Смирнова Светлана Юрьевна** (Smirnova S. Yu.), научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, smirnova-s-ju@yandex.ru

**Судариков Андрей Борисович** (Sudarikov A. B.), д. б. н., заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, dusha@blood.ru

**Кохно Алина Владимировна** (Kokhno A. V.), к. м. н., ведущий научный сотрудник отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, alina@blood.ru

**Моисеева Татьяна Николаевна** (Moiseeva T. N.), к. м. н., заведующая консультативным гематологическим отделением с дневным стационаром по проведению интенсивной и высокодозной химиотерапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, taniamoiseeva@mail.ru

**Луговская Светлана Алексеевна** (Lugovskaya S. A.), д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБУЗ ДПО РМАНПО МЗ РФ, slugovskaya@mail.ru

**Звонков Евгений Евгеньевич** (Zvonkov E. E.), д. м. н., заведующий отделением интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с кругло-

суточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, dr.zvonkov@gmail.com

**Савченко Валерий Григорьевич** (Savchenko V. G.), академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, director@blood.ru

## Литература

6. Виноградова Ю. Е., Луценко И. Н., Кременецкая А. М. и др. Структура T/NK-клеточных лимфатических опухолей в Гематологическом научном центре РАМН. Проблемы гематологии и переливания крови. 2005; 4(30):30–34.

12. Виноградова Ю. Е., Луценко И. Н., Самойлова Р. С. и др. Клинические и иммуноморфологические варианты T/NK-клеточных лимфолейкозов из больших гранулярных лимфоцитов. Гематология и трансфузиология. 2009; 54(2):14–18.

15. Хайдуков С. В., Байдун Л. В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса. Медицинский алфавит. 2015; 2(8):44–51.

16. Воробьев А. И., Воробьев И. А., Грецов Е. М. и др. Вопросы теоретической гематологии. Терапевтический архив. 2003; 75(9):22–29.

22. Сидорова Ю. В., Никитин Е. А., Меликян А. Л. и др. Определение T-клеточной клональности при инфекционном мононуклеозе методом ПЦР-SSCP-TCR  $\gamma$ . Гематология и трансфузиология 2004; 49(6):1–7.

Остальные источники см. в References.

## References

1. Loughran T. P. Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood*. 1993; 82(1):1–14.

2. Sokol L., Loughran T. P. Jr. Large granular lymphocyte leukemia. *Oncologist*. 2006; 11(3):263–273. DOI: 10.1007/s11899-007-0038-7.

3. Lamy T., Loughran T. P. Jr. Large granular lymphocyte leukemia. *Cancer Control*. 1998; 5(1):25–33.

4. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2017, 348–350.

5. Zambello R., Trentin L., Facco M. et al. Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes. *Cancer Res*. 1995; 55(24):6140–6145.

6. Vinogradova Yu. E., Lutsenko I. N., Kremenetskaya A. M. et al. Structure of T/NK-cell lymphomas in the National Research Center for Hematology of the Russian Academy of Medical Sciences. *Russian Journal of Problems of Hematology and Blood Transfusion (Problemy gematologii i perelivaniya krvi)*. 2005; 50(4):30–34. (In Russian)

7. Lamy T., Loughran T. P. Jr. Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. *Semin Hematol*. 2003; 40(3):185–195.

8. Sampalo Lainz A., López-Gómez M., Jimenez-Alonso J. Proliferation of large granular lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Rev Clin Esp*. 1995; 195(6):373–379.

9. Starkebaum G. Chronic neutropenia associated with autoimmune disease. *Semin Hematol*. 2002; 39(2):121–127.

10. Morice W. G., Kurtin P. J., Leibson P. J. et al. Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 120(6):1026–1036.

11. Semenzato G., Zambello R., Starkebaum G. et al. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood*. 1997; 89(1):256–260.

12. Vinogradova Yu. E., Lutsenko I. N., Samoylova R. S. et al. Clinical and immunomorphological variants of large granular lymphocyte T/NK lymphocytic leukemia. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2009; 54(2):14–18. (In Russian)

13. Vie H., Chevalier S., Garand R. et al. Clonal expansion of lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in a patient with large granular lymphocyte disorder. *Blood*. 1989; 74(1):285–290.

14. Dongen J. J., Langerak A. W., Bruggemann M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12):2257–2317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.

15. Khaydukov S. V., Baydun L. V. Modern approach to assessing cellular constituents immune status. *Russian Journal of Medical Alphabet. (Meditsinskiy alfavit)*. 2015; 2(8):44–51. (In Russian)

16. Vorobiev A. I., Vorobiev I. A., Gretsov E. M. et al. Problems of the theoretical hematology. *Russian Journal of Therapeutic Archive (Terapevicheskiy arkhiv)*. 2003; 75(9):22–29. (In Russian)

17. O’Keefe C. L., Plasilova M., Wlodarski M. et al. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL:a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol*. 2004; 172(3):1960–1969.

18. Wlodarski M. W., O’Keefe C., Howe E. C. et al. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2005; 106(8):2769–2780. DOI: 10.1182/blood-2004-10-4045.

19. Pandolfi F., Loughran T. P. Jr., Starkebaum G. et al. Clinical course and prognosis of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A multicenter study. *Cancer*. 1990; 65(2):341–348.

20. Sidorova Yu. V., Chernova N. G., Ryzhikova N. V. et al. Clonal rearrangements and malignant clones in peripheral T-cell lymphoma. *Acta Naturae (English version)*. 2015; 7(3):116–125.

21. Smirnova S., Sidorova Y., Chernova N. et al. CD8+ T-cell clones persistent in bone marrow and peripheral blood during course of CD4+ angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2017; 102(1):578, E1403.

22. Sidorova Yu. V., Nikitin E. A., Melikyan A. L. et al. Use of PCR-SSCP-TCR  $\gamma$  method to determine T-cell clonality in infectious mononucleosis. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2004; 49(6):1–7. (In Russian)

23. Smirnova S. J., Sidorova J. V., Biderman B. V. et al. Expansion of CD8+ cells in autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmunity*. 2016; 49(3):147–154. DOI: 10.3109/08916934.2016.1138219.

24. French L.E., Alcindor T., Shapiro M. et al. Identification of amplified clonal T cell populations in the blood of patients with chronic graft-versus-host disease: positive correlation with response to photopheresis. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 30(8):509–515. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703705.

25. Narumi H., Kojima K., Matsuo Y. et al. T-cell large granular lymphocytic leukemia occurring after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 33(1):99–101. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704298.

26. Au W. Y., Lam C. C., Lie A. K. et al. T-cell large granular lymphocyte leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol* 2003; 120(4):626–630. DOI: 10.1309/VA75-5A03-PVRV-9XDT.

27. Sychevskaya K. A., Smirnova S., Sidorova J. et al. Clonal T-lymphocyte populations in healthy donors. *Blood*. 2017; 130(1):3598.

# ПОИСК НОВЫХ МАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ МЕТОДОМ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Search of new prognostic markers of efficacy of therapy with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients using exome sequencing

Адильгереева Э. П.<sup>1</sup>, Лавров А. В.<sup>1,2</sup>, Смирнихина С. А.<sup>1</sup>, Чельшева Е. Ю.<sup>3</sup>, Шухов О. А.<sup>3</sup>, Цаур Г. А.<sup>4,5,6</sup>, Кочергин-Никитский К. С.<sup>1</sup>, Якушина В. Д.<sup>1</sup>, Морданов С. В.<sup>7</sup>, Туркина А. Г.<sup>3</sup>, Куцев С. И.<sup>1,2</sup>

Adilgereeva E. P.<sup>1</sup>, Lavrov A. V.<sup>1,2</sup>, Smirnikhina S. A.<sup>1</sup>, Chelysheva E. Y.<sup>3</sup>, Shukhov O. A.<sup>3</sup>, Tsauro G. A.<sup>4,5,6</sup>, Kochergin-Nikitsky K. S.<sup>1</sup>, Yakushina V. D.<sup>1</sup>, Mordanov S. V.<sup>7</sup>, Turkina A. G.<sup>3</sup>, Kutsev S. I.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup> ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1» Министерства здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>5</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>6</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>7</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Department of Molecular and Cellular Genetics, State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov» of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Scientific and Advisory Department of Chemotherapy of Myeloproliferative Disorders, Federal State-Funded Institution National Research Center for Hematology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> Regional Children Hospital 1, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>5</sup> Research Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>6</sup> Urals State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>7</sup> The Rostov State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov, Russian Federation

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — частое миелопролиферативное заболевание, характеризующееся патогенной активностью химерной тирозинкиназы *BCR/ABL*, которая стимулирует неконтролируемую пролиферацию клеток и нестабильность ДНК. Первичная резистентность или неоптимальный ответ на терапию ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) регистрируется примерно у 20% пациентов с ХМЛ.

**Цель работы:** обнаружение экзомных вариантов, связанных с неоптимальным ответом больных ХМЛ на таргетную терапию ИТК.

**Материалы и методы.** В исследование были включены восемь пациентов с Ph+ ХМЛ в хронической фазе.

## ABSTRACT

**Background.** Chronic myeloid leukemia (CML) is a common myeloproliferative disease characterized by pathologic activity of the fusion gene *BCR/ABL*, which encodes a tyrosine kinase that stimulates uncontrolled cell proliferation and DNA instability. Up to 20% of CML patients demonstrate primary resistance or non-optimal response to targeted tyrosine-kinase inhibitors (TKI) therapy.

**Objective.** To find new potential genetic markers of TKI resistance by whole exome sequencing.

**Materials and methods.** The study included eight patients with Ph+ CML in the chronic phase (CF). After 6 months of follow-up period patients were divided into two groups: four with an optimal response to TKI therapy and four with a non-

Через 6 мес наблюдения пациенты были разделены на две группы: четыре человека с оптимальным ответом на терапию ИТК и четыре человека с неоптимальным ответом. В группу валидации вошли 62 пациента (32 — с оптимальным и 30 — с неоптимальным ответом на терапию). Экзомное секвенирование проводили на платформе Ion Torrent PGM. Выравнивание проводили на геном человека (GRCh37). Секвенирование по Сэнгеру проводили на приборе ABI PRISM 3500xl. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ MS Office Excel, SPSS21.

**Результаты и заключение.** По результатам экзомного секвенирования выделено семь вариантов, ассоциированных с ответом на терапию: ANKRD35-rs11579366, DNAH9-rs1990236, MAGEC1-rs176037, TOX3-rs10653661, THSD1-rs3803264, MORN2-rs3099950, PTCRA-rs9471966. Валидация этих вариантов на дополнительной выборке больных ( $n = 62$ ) и поиск ассоциаций различных сочетаний генотипов и гаплотипов с ответом на терапию не позволил однозначно выделить варианты, ассоциированные с неоптимальным ответом на терапию ИТК. Кроме того, были исследованы варианты в 9000 генах, в результате чего удалось обнаружить 75 генов, достоверно различающихся по количеству вариантов между группами. Анализ обогащения показал, что выявленные гены участвуют в регуляции клеточной адгезии, межклеточных контактов, антигенной активации Т-лимфоцитов, опосредованном ингибировании  $\alpha$ ИФН сигнального пути, отвечающего за антипролиферативный эффект. Также была выявлена связь многих из этих генов с развитием различных злокачественных новообразований (рак почки, легкого и молочной железы). Многофакторная природа ответа на терапию, безусловно, осложняет поиск прогностических факторов.

**Ключевые слова:** хронический миелоидный лейкоз, ингибиторы тирозинкиназ, экзомное секвенирование, резистентность к ингибиторам тирозинкиназ

**Для цитирования:** Адильгереева Э. П., Лавров А. В., Смирнихина С. А., Челышева Е. Ю., Шухов О. А., Цаур Г. А., Кочергин-Никитский К. С., Якушина В. Д., Морданов С. В., Туркина А. Г., Куцев С. И. Поиск новых маркеров эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ при хроническом миелоидном лейкозе методом полноэкзомного секвенирования. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):134–143

doi: 10.25837/HAT.2018.61..2..004

**Для корреспонденции:** Лавров Александр Вячеславович, к. м. н., заведующий лабораторией мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия. Электронная почта: avlavrov@yandex.ru

optimal response. The validation group included 62 patients (32 with optimal and 30 with non-optimal response to therapy). Exome sequencing was performed using the Ion Torrent PGM platform. Alignment was performed on the human genome (GRCh37). Sanger sequencing was conducted on an ABI PRISM 3500xl. Statistical processing of the results was carried out using MS Office Excel and SPSS21.

**Results and conclusion.** Exome sequencing revealed seven single-nucleotide variants (SNVs) associated with therapy outcomes: ANKRD35-rs11579366, DNAH9-rs1990236, MAGEC1-rs176037, TOX3-rs10653661, THSD1-rs3803264, MORN2-rs3099950, and PTCRA-rs9471966. Validation of these variants in 62 patients did not confirm prognostic role of any of the individual SNVs or their combinations. An additional analysis of the number of SNVs in 9000 genes revealed 75 genes with significant differences in the number of SNVs. Enrichment analysis showed that these genes are involved in cell adhesion, cell contacts, T-cell antigen activation, and inhibition of IFN $\alpha$ -mediated antiproliferative signaling. Many of these genes are also associated with a variety of cancers (renal, lung and breast cancer). Possible multifactorial nature of the efficacy of therapy complicates the search of new prognostic markers.

**Keywords:** chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, exome sequencing, TKI resistance

**For citation:** Adilgereeva E. P., Lavrov A. V., Smirnikhina S. A., Chelysheva E. Y., Shukhov O. A., Tsaur G. A., Kochergin-Nikitsky K. S., Yakushina V. D., Mordanov S. V., Turkina A. G., Kutsev S. I. Search of new prognostic markers of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients using exome sequencing. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):134–143 (in Russian)  
doi: 10.25837/HAT.2018.61..2..004

**For correspondence:** Alexander V. Lavrov, Laboratory of Mutagenesis, Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moskvorechie, 1, Moscow, 115478, Russian Federation, Associate Professor of the Department of Molecular and Cell Genetics, The Russian National Research Medical University Named after N. I. Pirogov. Postal address: 117997, Moscow, Russian Federation, +7-499-324-3579, avlavrov@yandex.ru

**Information about authors:**

Adilgereeva E. P., <https://orcid.org/0000-0002-6440-0500>;  
Lavrov A. V., <https://orcid.org/0000-0003-4962-6947>;  
Smirnikhina S. A., <https://orcid.org/0000-0002-1558-3048>;  
Chelysheva E. Y., <https://orcid.org/0000-0001-6423-1789>;  
Shukhov O. A., <https://orcid.org/0000-0001-5393-0816>;  
Tsaur G. A., <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>;  
Kochergin-Nikitsky K. S., <https://orcid.org/0000-0002-0096-4542>;  
Yakushina V. D., <https://orcid.org/0000-0001-5236-9297>;  
Mordanov S. V., <https://orcid.org/0000-0001-7924-4945>;  
Turkina A. G., <https://orcid.org/0000-0001-9947-2371>;  
Kutsev S. I. <https://orcid.org/0000-0002-3133-8018>.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 8113 от 28.08.2012).

**Конфликт интересов.** Смирнихина С. А. получала финансирование для участия в конференциях от Биолайн и Новартис Фарма. Лавров А. В. получил финансирование от компании Thermo Fisher Scientific Corporation. Челышева Е. Ю. была консультантом Новартис Фарма, участвовала в заседании экспертов Новартис Фарма, Bristol-Myers Squibb. Туркина А. Г. была консультантом, участвовала в заседании экспертов и получала финансирование от Bristol-Myers Squibb, Новартис и Pfizer. Куцев С. И. участвовал в заседании экспертов Новартис Фарма и Pfizer.

Все остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.06.2018

Принята к печати 15.10.2018

**Financial disclosure.** This work was partly supported by the Russian Ministry of Education and Science (grant #8113 from 28.08.2012).

**Conflict of interests.** Svetlana A Smirnikhina received funding of travel, accommodations, or expenses from Bioline and Novartis Farma. Alexander V. Lavrov received funding of travel from Thermo Fisher Scientific Corporation. Ekaterina Y. Chelysheva served as a consultant for Novartis, participated on the Speakers' bureau of Novartis, Bristol-Myers Squibb. Anna G. Turkina served as a consultant/advisor, participated on the Speakers' bureau, and received honoraria from Bristol-Myers Squibb, Novartis and Pfizer. Sergey I. Kutsev participated on the Speakers' bureau of Novartis and Pfizer.

Other authors reported no conflicts of interests.

Received 22 Jun 2018

Accepted 15 Oct 2018

## Введение

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся появлением в гемопоэтической стволовой клетке специфического цитогенетического маркера — так называемой филадельфийской (Ph<sup>'</sup>) хромосомы. Ph<sup>'</sup>-хромосома возникает в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22, вследствие чего образуется химерный ген *BCR/ABL1*, кодирующий химерный белок с тирозинкиназной активностью. ХМЛ составляет 15—20% всех выявленных впервые случаев лейкозов у взрослых. По данным популяционного исследования в 6 регионах Российской Федерации, заболеваемость ХМЛ составляет 0,7 на 100 000 взрослого населения [1]. Соотношение заболевших мужчин и женщин — 1,16:1 [2]. Открытие *BCR/ABL1* сыграло важную роль в понимании патогенеза ХМЛ, что привело к разработке новых таргетных препаратов для лечения заболевания. На сегодняшний день существуют три поколения ингибиторов тирозинкиназ (ИТК), используемых для лечения ХМЛ: ИТК 1-го поколения — иматиниб, ИТК 2-го поколения — нилотиниб, бозутиниб, дазатиниб, ИТК 3-го поколения — понатиниб [3]. Несмотря на значительный успех в лечении больных ХМЛ [4], у некоторых пациентов может отмечаться как первичная резистентность к терапии ИТК, которая проявляется в отсутствии достижения полного гематологического ответа (ПГО), полного цитогенетического ответа (ПЦО), большого молекулярного ответа (БМО), так и вторичная резистентность, характеризующаяся потерей уже достигнутого ранее ответа на лечение [5]. Существуют две группы механизмов резистентности к терапии ИТК: *BCR/ABL1*-зависимые механизмы (амплификация *BCR/ABL*, мутации киназного домена) [6] и *BCR-ABL1*-независимые механизмы [7]. *BCR/ABL1*-зависимые механизмы приводят обычно к вторичной резистентности, развивающейся при утрате первоначально успешного ответа на терапию. Для определения причин вторичной резистентности используют моле-

кулярно-генетические методы диагностики, включая определение мутаций *BCR/ABL1*. Однако до сих пор не известны причины первичной резистентности и, соответственно, не существует методов прогнозирования неоптимального ответа на терапию ИТК. Широко используемые шкалы Sokal и EUTOS, на основании которых формируются группы риска пациентов с ожидаемо худшим клиническим исходом, основаны на оценке только клиническо-демографических данных. В шкалу Sokal, которая впервые была предложена еще до применения ИТК, в качестве прогностически неблагоприятного фактора включен возраст пациентов. В настоящее время прогностическая ценность этих шкал подвергается сомнениям [8, 9]. Ранее неоднократно предпринимались попытки определения причин первичной резистентности, поиск молекулярных маркеров эффективности терапии или прогрессии заболевания, а также стабильности ремиссии [10—17]. В качестве маркеров рассматривали уровни экспрессии генов *pSyc348*, *ILIRAP* [18—21], однонуклеотидные варианты (ОНВ) в гене *FAS* [22], *микроРНК-150* и *микроРНК-29A/B* [23], TGF- $\alpha$ , IL-6 [24] и др. Однако пока не удалось выявить маркеры, которые обладали бы высокой чувствительностью и специфичностью в прогностической оценке эффективности терапии и глубины ответа. Поиск факторов, раннее обнаружение которых оказало бы значительное влияние на прогноз развития заболевания и терапию ХМЛ, остается актуальной задачей. Цель настоящего исследования — выявить с помощью полноэкзомного секвенирования у пациентов с впервые выявленным ХМЛ потенциальные прогностические маркеры и проверить их прогностическую ценность на выборках больных ХМЛ с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК.

## Материалы и методы

В проспективное исследование по экзомному секвенированию (Протокол заседания этического комитета

ФГБНУ Медико-генетический научный центр № 6 от 2 июля 2012 г.) были включены 8 пациентов с установленным диагнозом Ph+ ХМЛ в хронической фазе (ХФ). Периферическую кровь забирали в пробирки с ЭДТА в момент установления диагноза до начала терапии ИТК. Через 6 мес наблюдения в соответствии с рекомендациями European Leukemia Net (ELN) 2013 г. [25] пациенты были разделены на две группы: 4 человека с оптимальным ответом на терапию ИТК и 4 человека с неоптимальным ответом (в группу с неоптимальным ответом вошли пациенты группы «предупреждение» и группы «неудача терапии», согласно критериям ELN). Оптимальному ответу на терапию соответствуют показатели молекулярного ответа *BCR-ABL1* < 1% и полного цитогенетического ответа (Ph+ 0%). Неоптимальному ответу — *BCR-ABL1* > 1% и/или цитогенетический ответ Ph+ > 10%. Пациентам, не имеющим оптимального ответа на терапию, было выполнено секвенирование гена *BCR/ABL1*, подтвердившее отсутствие мутаций киназного домена. В обеих группах число мужчин и женщин было равным, медиана возраста составила 45,5 года в группе пациентов с оптимальным ответом и 47,2 года в группе пациентов с неоптимальным ответом соответственно. Подробная характеристика пациентов представлена.

Для валидации находок при экзомном секвенировании была сформирована выборка пациентов с использованием тех же критериев включения. В группу валидации вошли 62 пациента с впервые выявленным ХМЛ (32 — с оптимальным и 30 — с неоптимальным ответом на терапию).

От всех пациентов было получено информированное согласие на включение их в исследование.

### Экзомное секвенирование

ДНК выделяли из периферической крови с помощью набора Quick-gDNA™ Blood Mini Prep (Zymo Research) по протоколу производителя. Экзомное секвенирование проводили на платформе Ion Torrent Personal Genome Machine с использованием наборов Life Technologies Ion Target Seq™ ExomeKits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США), Exome Enrichment Kit (Life Technologies, США), Ion PGM™ 200 Sequencing Kit. Среднее покрытие каждого нуклеотида — 20. Равномерность покрытия — 92%.

### Биоинформатический анализ

Выравнивание проводили на геном человека (GRCh37 <http://updates.iontorrent.com/reference/hg19>) с использованием программного обеспечения Torrent Suite (TS) v. 3.6.2, BAM-файлы проанализированы при помощи плагина Variant Caller v 5.0.3.5. Найденные варианты (однонуклеотидные варианты, вставки и делеции от одного до нескольких нуклеотидов) были аннотированы при помощи программ ANNOVAR, Partek Genomics Suite (Partek, St. Louis, Missouri, USA) и Variant Effect

Predictor tool. Partek Genomics Suite и MS Office Excel были использованы для отбора вариантов. Процесс выбора вариантов был подробно описан ранее [26, 27].

### Секвенирование по Сэнгеру

Праймеры для секвенирования по Сэнгеру подбирали при помощи программы Primer Designer™ Tool (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Для амплификации и секвенирования использовали одни и те же праймеры. Секвенирование образцов для подтверждения находок полноэкзомного секвенирования проводили с прямого и обратного праймеров на приборе ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems). Последовательности праймеров указаны в табл. 1. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch™ Bio-Rad (США) по следующему протоколу: 95 °С 5 мин, [95 °С 5 с, 65 °С 10 с, 72 °С 20 с] × 39 циклов. Секвенирование в группе пациентов для валидации проводили с одного праймера.

### Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ MS Office Excel, SPSS21. Использовали методы  $\chi^2$  и критерий Манна—Уитни. Методом  $\chi^2$  проводили сравнение частот генотипов и аллелей, найденных вариантов в группах больных ХМЛ с оптимальным ответом на терапию и неоптимальным ответом на терапию ИТК в валидационной выборке пациентов. Критерий Манна—Уитни использовали для обнаружения генов, различающихся по числу вариантов между группами. Анализ гаплотипов был выполнен с помощью пакета R Haplo.stats (version 1.7.7) [28], построена бинарная логистическая регрессия и посчитано отношение шансов для оценки связи гаплотипов и ответа на терапию.

## Результаты

### Экзомное секвенирование

По результатам экзомного секвенирования выявили от 33 657 до 38 636 гомо- и гетерозиготных вариантов, в том числе однонуклеотидные варианты (ОНВ), небольшие вставки и делеции (инделлы). Около 5300 вариантов были уникальными для каждого образца. Варианты были найдены в 17 741 гене. В каждом гене мы обнаружили от одного до 345 вариантов (*MUC16*). Полный список генов с числом найденных вариантов и процесс выбора вариантов детально описаны ранее [26, 27]. В результате фильтрации обнаруженных вариантов было отобрано семь, которые могут являться прогностическими маркерами неоптимального ответа на терапию ИТК. Пять из них (*ANKRD55*-rs11579366, *DNAH9*-rs1990236, *MAGEC1*-rs176037, *TOX3*-rs10653661, *THSD1*-rs3803264) были выявлены в группе пациентов с оптимальным ответом на терапию ИТК и не встретились у пациентов с неоптимальным ответом и два (*MORN2*-rs3099950, *PTCRA*-rs9471966), напро-

**Таблица 1.** Последовательность праймеров для секвенирования по Сэнгеру  
**Table 1.** Primers' sequence for Sanger sequencing

Гены Genes	Размер ампликона Amplicon size	Нуклеотидная последовательность праймеров Sequence of primers	Каталожные номера Life Technologies Catalogue numbers of Life Technologies
ANKRD35F	507	GCAACAGTAACTTGCTGGAGGAGTT	Hs00399911_CE
ANKRD35R		CTTCCCCAGGTCTTGCTCCAGA	
DNAH9 F	511	ATAACTCTGTCTGCCTGGGTGC	Hs00162006_CE
DNAH9 R		ATTCCAAGCTTTACCTGTGTGCCA	
MAGEC1F	492	TTCTCCTGAGAGCGACGACAC	Hs00488640_CE
MAGEC1 R		CGGCTCACAGGAATCTGGAGT	
TOX3 F	512	TTCAGATGTGGTGTGCCTTTTAAAT	Hs00155834_CE
TOX3 R		GCTATCTGAACTCCTGAAGCCCTAA	
THSD1F	508	TGGCACCATCACCAGTTTGTATCC	Hs00132739_CE
THSD1R		CAACCAGTCCCAGGGAACACTA	
MORN2 F	544	AAAGCAAAGCTTGAAAGTAGAGGAT	Hs00193190_CE
MORN2 R		GGACACACAAGCACAACTAGAAA	
PTCRA F	509	GAACCCTAGCCTACAACACAATGCT	Hs00274873_CE
PTCRA R		TGGACACCCTTCATGCCTTTGTG	

тив, были характерны для группы пациентов с неоптимальным ответом.

### Верификация полученных результатов

Результаты секвенирования по Сэнгеру подтвердили данные, полученные с помощью экзомного секвенирования. Только в одном образце больного с неоптимальным ответом на терапию по данным секвенирования по Сэнгеру был обнаружен вариант rs10653661 в гене *TOX3* в гетерозиготном состоянии, тогда как при экзомном анализе альтернативный аллель обнаружен не был из-за плохого прочтения (покрытия) данного региона в образце.

### Валидация полученных результатов

Для проверки прогностической ценности отобранных вариантов были сформированы две группы пациентов с ХМЛ: с оптимальным ответом ( $n = 32$ ) и с неоптимальным ответом ( $n = 30$ ). Оценку ответа на терапию ИТК проводили на сроке 6 мес от момента начала терапии, в соответствии с рекомендациями ELN 2013. Генотипирование по 7 отобранным генетическим вариантам проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру (табл. 2). Как видно из таблицы, частоты генотипов и аллелей по изучаемым локусам не различаются между группами пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК. Для генов *ANKRD35* ( $p = 0,16$ ), *MORN2* ( $p = 0,48$ ) и *PTCRA* ( $p = 0,88$ ) частота генотипа (аллеля), предположительно связан-

ного с ответом на терапию, выше в группе пациентов с оптимальным ответом, а для генов *DNAH9* ( $p = 0,33$ ), *MAGEC1* ( $p = 0,68$ ), *TOX3* ( $p = 0,87$ ), *THSD1* ( $p = 0,38$ ), наоборот, аллель, предположительно связанный с реагированием на терапию, представлен чаще в группе пациентов с неоптимальным ответом.

### Анализ ассоциаций комбинаций генотипов и гаплотипов с ответом на терапию ИТК

С целью проверки возможного наличия связи между ответом на терапию и комбинациями генотипов в нескольких генах была проведена оценка ассоциации специфических сочетаний генотипов по выбранным генам с ответом на терапию ИТК. Всего было выявлено 30 комбинаций генотипов среди 62 обследованных пациентов. В группе с оптимальным ответом на терапию было обнаружено 17 различных сочетаний, тогда как в группе с неоптимальным ответом — 21; 8 из них были общими и встречались в обеих группах. В связи с тем, что число комбинаций генотипов сопоставимо с числом пациентов в группах, поиск ассоциаций невозможен.

Следующим этапом был анализ ассоциации ответа на терапию с гаплотипами (различными сочетаниями аллелей в выбранных генах). С помощью пакета R Haplo.stats была построена бинарная логистическая регрессия и посчитано отношение шансов для оценки связи гаплотипов и ответа на терапию. Поскольку истинное сцепление аллелей разных генов неизвестно, то гаплотипы были оценены косвенным образом.

**Таблица 2.** Сравнение частот генотипов и аллелей ANKRD35 (rs11579366), DNAN9 (rs1990236), MAGEC1 (rs176037), TOX3 (rs10653661), THSD1 (rs3803264), MORN2 (rs3099950), PTCRA (rs9471966) в группах больных ХМЛ с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК  
**Table 2.** Comparison of genotypes and alleles frequencies ANKRD35 (rs11579366), DNAN9 (rs1990236), MAGEC1 (rs176037), TOX3 (rs10653661), THSD1 (rs3803264), MORN2 (rs3099950), PTCRA (rs9471966) in CML patients with optimal and non-optimal response to TKI therapy

Хромосома: позиция Chromosome: position	Ген Gene	№dbSNP141	Реф. аллель Reference allele	Альт. аллель Alter- native allele	Группа пациентов с оптимальным ответом (n = 32) Group of patients with optimal response (n = 32)				Группа пациентов с неоптимальным ответом (n = 30) Group of patients with non- optimal response (n = 30)				p	Группа пациентов с оптимальным ответом (n = 32) Group of patients with optimal response (n = 32)		Группа пациентов с неоптимальным ответом (n = 30) Group of patients with non-optimal response (n = 30)	
					Генотип, % geno- types, %		Генотип, % geno- types, %		Генотип, % geno- types, %		Генотип, % geno- types, %			Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %
					Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %		Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %
1:145562293	ANKRD35	rs11579366	G	C	G/G, 9	G/C, 50	C/C, 41	G/G, 29	G/C, 39	C/C, 32	G/C, 32	0,16	G, 34	C, 66	G, 48	C, 52	
17:11865462	DNAN9	rs1990236	G	A	G/G, 72	G/A, 22	A/A, 6	G/G, 57	G/A, 39	A/A, 4	A/A, 4	0,33	G, 83	A, 17	G, 77	A, 23	
X:140993642	MAGEC1	rs176037	C	T	C/C, 53	C/T, 20	T/T, 27	C/C, 41	C/T, 32	T/T, 27	T/T, 27	0,68	C, 63	T, 37	C, 57	T, 43	
16:52472421	TOX3	rs10653661	A	ATTCT	A/A, 22	A/ATTCT, 56	ATTCT/ATTCT, 22	A/A, 23	A/ATTCT, 50	ATTCT/ATTCT, 27	ATTCT/ATTCT, 27	0,87	A, 50	ATTCT, 50	A, 48	ATTCT, 52	
13:52971893	THSD1	rs3803264	G	A	G/G, 6	G/A, 44	A/A, 50	G/G, 11,5	G/A, 27	A/A, 61	A/A, 61	0,38	G, 28	A, 72	G, 25	A, 75	
2:39109558	MORN2	rs3099950	G	A	G/G, 69	G/A, 31	A/A, 0	G/G, 77	G/A, 23	A/A, 0	A/A, 0	0,48	G, 84	A, 16	G, 77	A, 23	
6:42891022	PTCRA	rs9471966	G	A	G/G, 56	G/A, 38	A/A, 6	G/G, 50	G/A, 43	A/A, 7	A/A, 7	0,88	G, 75	A, 25	G, 72	A, 28	
					<b>Генотип или аллель соответствует генотипу пациентов с неоптимальным ответом на терапию ИТК</b> The genotype or allele corresponds to the genotype of patients with a non-optimal response to TKI therapy												
					<b>Генотип или аллель соответствует генотипу пациентов с оптимальным ответом на терапию ИТК</b> The genotype or allele corresponds to the genotype of patients with the optimal response to TKI therapy												
					<b>Генотип с неопределенным значением</b> The genotype with undetermined value												

В анализ были взяты только те гаплотипы, которые встретились 3 раза и более. Таким образом, общее число анализируемых гаплотипов составило 26. В результате анализа не удалось обнаружить достоверной ассоциации какого-либо из представленных гаплотипов с ответом на терапию ( $p = 0,94$ ). Учет поправки на пол и возраст также не изменил результата ( $p = 0,97$ ). Анализ отношения шансов не позволил выявить достоверной ассоциации гаплотипов и ответа на терапию ( $p = 0,87$ ). Однако было выявлено сочетание генотипов, встречающееся у четверых пациентов из группы с оптимальным ответом на терапию и ни разу не встретившееся в группе пациентов с неоптимальным ответом: *ANKRD35(C/C) DNAH9(G/G) TOX3(A/ATTTCT) THSD1(A/G) MORN2(G/A) PTCRA(G/A)*, также был обнаружен один гаплотип, встретившийся только в группе с оптимальным ответом *ANKRD35(C) DNAH9(A) TOX3(A)THSD1(A) MORN2(G) PTCRA(A)*.

### Анализ ассоциации между количеством генетических вариантов и ответом на терапию ИТК

Для поиска у пациентов с разным ответом на терапию ИТК возможных неспецифических различий, проявляющихся в различном числе мутаций в разных генах, был проведен полноэкзомный анализ ассоциации числа генных вариантов с ответом на терапию ИТК. Было проанализировано количество вариантов во всех генах у 4 пациентов с оптимальным ответом на терапию и 4 пациентов с неоптимальным ответом. Из анализа были исключены делеции и вставки в гомополимерных районах в связи с высокой частотой ложных находок, что является ограничением технологии полупроводникового высокопроизводительного секвенирования. Также не учитывали варианты в высокогомологичных участках, например в псевдогенах, так как для таких областей характерны ошибки картирования. Варианты, зарегистрированные в таких областях, требуют исключительно индивидуальной ручной проверки и не могут быть корректно учтены при анализе больших объемов данных. Для каждого гена были подсчитаны суммарные количества вариантов для пациентов, ответивших на лечение и не достигших оптимального ответа. Всего таким образом проанализировано 9000 генов, 75 из которых имели статистически достоверное различие в количестве вариантов, у пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом ( $p < 0,05$ ). В большинстве генов (49) число вариантов преобладало в группе оптимально ответивших на терапию. Анализ обогащения данными генами с помощью Enrichr [29, 30] показал их вовлеченность в сигнальный путь RAS. Кроме того, многие из этих генов связаны с развитием рака почки, рака легкого и молочной железы [31].

### Обсуждение

На сегодняшний день опубликовано несколько работ разных научных коллективов, описывающих попытки

обнаружения генетических вариантов, отвечающих за прогрессию и возникновение ХМЛ, при помощи массового параллельного секвенирования. У. Huang и соавт. была проведена работа по поиску вариантов, отвечающих за прогрессию заболевания. В исследовании приведены результаты полноэкзомного секвенирования одного пациента на разных стадиях заболевания: в фазе акселерации и в фазе бластного криза. По результатам секвенирования было выявлено 9 вариантов в 9 генах: *ENO1, COL5A1, AFP, SERPINA1, MGAT5B, ZNF208, ANO5, GATA2* и *MAX*, которые, по мнению авторов, могут играть важную роль в процессе прогрессии ХМЛ от фазы акселерации до бластного криза, а также помогут улучшить понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе прогрессии заболевания, и облегчить обнаружение потенциальных мишеней для лекарственных средств [32]. В исследовании S. Sabri и соавт. по обнаружению специфических для ХМЛ генетических изменений на молекулярном уровне было проведено экзомное секвенирование 4 пациентов с ХМЛ, однако не удалось выявить вариантов, ответственных за возникновение и развитие заболевания. Авторы указывают на две вероятные причины: патогенез заболевания и технические ограничения метода [33]. Ни в одной из этих работ не приводятся результаты верификации найденных вариантов.

Для поиска новых прогностических маркеров эффективности терапии ХМЛ ИТК в настоящей работе проведено полноэкзомное секвенирование пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК. Поиск возможных маркеров проводили, проверяя две гипотезы: наличие сильно ассоциированных, патогенетически связанных с развитием ХМЛ, вариантов и генов с этими вариантами, а также наличие генов с большим количеством функциональных вариантов в одной из групп больных ХМЛ. Первая гипотеза предполагает значительный генетический компонент в развитии ответа на терапию ИТК и функциональную связь между эффективностью и потенциальными маркерами, поэтому поиск таких маркеров строили на предположении, что искомый вариант должен встречаться у всех (или почти всех) пациентов одной группы и отсутствовать у пациентов другой, обладать возможностью менять функцию гена, а сам ген (или искомый вариант) должен быть связан с патогенезом опухолей. Исходя из этих предположений и с учетом данных dbSNP, Gene Cards, OMIM для дальнейшего исследования возможной предиктивной значимости были выбраны 7 вариантов в 7 генах (*ANKRD35*-rs11579366, *DNAH9*-rs1990236, *MAGEC1*-rs176037, *TOX3*-rs10653661, *THSD1*-rs3803264, *MORN2*-rs3099950, *PTCRA*-rs9471966). Гены *ANKRD35*, *DNAH9*, *MAGEC1*, *TOX3* ассоциированы с онкологическими заболеваниями; гены *THSD1*, *MORN2*, *PTCRA* участвуют в сигнальных путях при онкологических заболеваниях. Более подробно процедура выбора и функции генов описаны ранее [26].

Верификация отобранных вариантов секвенированием по Сэнгеру показала высокую точность метода полноэкзомного секвенирования — 98,2%. Единственное расхождение обусловлено биоинформатическими особенностями анализа больших объемов данных и может быть легко скорректировано изменением настроек автоматического распознавания генотипов и введением дополнительной проверки на качество покрытия каждого нуклеотида. Тем не менее секвенирование по Сэнгеру рекомендуется проводить как независимый и точный метод проверки находок высокопроизводительного секвенирования. На сегодняшний день секвенирование по Сэнгеру является «золотым стандартом» верификации данных, полученных методом секвенирования следующего поколения.

Несмотря на то что поиск возможных прогностических факторов был основан на функциональном анализе потенциальных кандидатов, прогностическую ценность отобранных вариантов необходимо было проверить на независимой выборке больных ХМЛ. Валидацию провели на 2 выборках пациентов, отобранных по тем же критериям, что и пациенты для экзомного анализа: больные ХМЛ с оптимальным ( $n = 32$ ) и неоптимальным ответом на терапию ( $n = 30$ ). Результаты валидации показали, что частоты генотипов и аллелей по изучаемым локусам не имеют статистически достоверных различий между группами пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК: *ANKRD35*-rs11579366 ( $p = 0,16$ ), *DNAH9*-rs1990236 ( $p = 0,33$ ), *MAGEC1*-rs176037 ( $p = 0,68$ ), *TOX3*-rs10653661 ( $p = 0,87$ ), *THSD1*-rs3803264 ( $p = 0,38$ ), *MORN2*-rs3099950 ( $p = 0,48$ ), *PTCRA*-rs9471966 ( $p = 0,88$ ). Однако, как было показано выше, частоты генотипов и аллелей, предположительно связанных с ответом на терапию, для генов *ANRRD35*, *MORN2* и *PTCRA* действительно выше в группе пациентов с оптимальным ответом, а для генов *DNAH9*, *MAGEC1*, *TOX3*, *THSD1*, наоборот, аллель, предположительно связанный с реагированием на терапию, представлен выше в группе пациентов с неоптимальным ответом, хотя внутригрупповое распределение частот аллелей по выбранным генам не различается между группами.

Нами было исследовано наличие возможных ассоциаций каких-либо комбинаций генотипов по исследованным вариантам с ответом на терапию. В результате проведенного анализа удалось выявить одно сочетание генотипов, которое встречалось у четверых пациентов с оптимальным ответом и не встречалось у пациентов с неоптимальным ответом. Несмотря на то что случайное обогащение группы одним из сочетаний генотипов маловероятно (общее число комбинаций 32), подтвердить или опровергнуть роль данной комбинации не представляется возможным на имеющейся группе пациентов. Также был выявлен гаплотип, характерный только для группы оптимального ответа. Не удалось обнаружить статистически достоверных ассоциаций различных сочетаний генотипов и гаплотипов с эф-

фективностью терапии ИТК ( $p = 0,93647$ ). По всей видимости, размер доступных для анализа выборок не позволяет сделать заключение о наличии ассоциации каких-либо сочетаний генотипов или гаплотипов с ответом на терапию.

Отрицательные результаты, по-видимому, объясняются тем, что при полноэкзомном исследовании в каждом образце обнаруживают десятки тысяч вариантов, и даже после фильтрации по функциональным критериям их остается достаточно много для исключения возможности обнаружения случайных различий между тестируемыми выборками. По этой причине такие находки должны быть проверены на независимых выборках.

Варианты, которые могут влиять на различную эффективность терапии ИТК при ХМЛ, могут быть нейтральными и не приводить к развитию какого бы то ни было патологического процесса в организме у людей, не страдающих ХМЛ. Общепопуляционная частота этих вариантов может быть достаточно высокой, что, конечно, затрудняет поиски и определение их значимости в развитии резистентности к терапии.

Вторая гипотеза при поиске прогностических маркеров эффективности терапии ИТК основана, напротив, на идее сложного полигенного характера причин различий в ответе на терапию. Мы предположили, что пациенты с разной эффективностью ответа могут отличаться совокупной вариативностью генов, вовлеченных в патогенез ХМЛ и механизмы терапевтического действия ИТК. То есть различное количество вариантов, достоверно различающееся между группами в отдельных генах, может оказывать совокупный эффект на развитие или отсутствие оптимального ответа на терапию. При этом полностью эти механизмы остаются не изученными и сам перечень генов неизвестен. Для проверки этой гипотезы был проведен подсчет общего числа вариантов в каждом гене. Нами были проанализированы 9000 генов, среди которых 75 генов имеют статистически достоверные различия в количестве вариантов между группами ( $p < 0,05$ ). Анализ обогащения, выполненный для 49 генов, число вариантов в которых было больше среди оптимально ответивших на терапию, показал их связь с RAS1 сигнальным путем. RAS1 является ГТФ-азой, вовлеченной в регуляцию клеточной адгезии и межклеточных контактов. Интересно отметить, что среди эффекторов RAS1 известны RAS1 и RAS1, участвующие в антигенной активации Т-лимфоцитов и обеспечении их адгезионной функции [34]. Кроме того, именно белки семейства RAS1 вовлечены в BCR-ABL-опосредованное ингибирование  $\alpha$ ИФН сигнального пути, отвечающего за антипролиферативный эффект [35]. Все это в совокупности является косвенным указанием на роль иммунной системы в ответе больных ХМЛ на таргетную терапию. А выявление связи многих из этих генов с развитием других злокачественных новообразований (рак почки, легкого и молочной железы) указывает на возможность существования BCR-ABL-независимых

факторов, влияющих на патогенез ХМЛ. При этом избытие патогенетических путей, генов и возможных полиморфизмов в них указывает на многофакторную природу ответа на терапию, что, безусловно, осложняет поиск прогностических факторов и требует развития персонализированных терапевтических подходов.

В настоящее время проведено множество исследований, в которых изучается проблема резистентности к терапии ИТК и прогрессии ХМЛ, однако, по нашим данным, исследований по оценке глубины ответа и различной эффективности терапии ИТК у больных ХМЛ при помощи полноэкзомного анализа в мире ранее никем не проводилось. В результате выполненного анализа удалось выявить ОНВ в генах, участвующих в различных онкологических процессах, в том числе гемобластозах. Однако при проверке данных находок на группах пациентов ассоциации вариантов с глубиной ответа на терапию выявлено не было.

Поиск отдельных вариантов, ответственных за возникновение, развитие резистентности и прогрессию заболевания, — очень сложная задача. К решению этих проблем стоит подходить с использованием комплекса современных технологий, таких как полноэкзомное и полногеномное секвенирование, хромосомный микроматричный анализ, исследование транскриптома и микроРНК. Подобные исследования следует проводить на больших выборках пациентов. Такой подход может дать более полную и ясную картину развития патологического процесса в организме людей, страдающих ХМЛ.

#### Информация об авторах

**Адилгереева Эльмира Пайзутдиновна** (Adilgerееva E. P.), научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, elmira5376@gmail.com

**Лавров Александр Вячеславович** (Lavrov A. V.), к. м. н., заведующий лабораторией мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, avlavrov@yandex.ru

**Смирнихина Светлана Анатольевна** (Smirnikhina S. A.), к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, smirnikhinas@gmail.com

**Челышева Екатерина Юрьевна** (Chelysheva E. Y.), к. м. н., врач-гематолог, старший научный сотрудник отделения химиотерапии миело-пролиферативных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия, denve@bk.ru

**Шухов Олег Александрович** (Shukhov O. A.), к. м. н., врач-гематолог, научный сотрудник отделения химиотерапии миело-пролиферативных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия, shuhov@list.ru

**Цаур Григорий Анатольевич** (Tsaur G. A.), д. м. н., заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии отдела детской онкологии и гематологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1» Министерства здравоохранения Свердловской области, 620149, г. Екатеринбург, Россия, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург, Россия, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории терапии онко-гематологических заболеваний ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620026, Екатеринбург, Россия, tsaur@mail.ru

**Кочергин-Никитский Константин Сергеевич** (Kochergin-Nikitsky K. S.), к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, KochNik.KS@gmail.com

**Якушина Валентина Дмитриевна** (Yakushina V. D.), к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, vdyakushina@gmail.com

**Морданов Сергей Викторович** (Mordanov S. V.), к. м. н., заведующий лабораторией медицинской генетики, ассистент кафедры по курсу генетики и лабораторной генетики, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия, labmed@mail.ru

**Туркина Анна Григорьевна** (Turkina A. G.), д. м. н., профессор, врач-гематолог, заведующая научно-консультативным отделением химиотерапии миело-пролиферативных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия, turkianna@yandex.ru

**Куцев Сергей Иванович** (Kutsev S. I.), д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, Россия, зав. кафедрой молекулярной и клеточной генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, kutsev@mail.ru

#### Литература

- Куликов С. М., Виноградова О. Ю., Челышева Е. Ю. и др. Заболеваемость хроническим миелолейкозом в 6 регионах России по данным популяционного исследования 2009—2012 гг. Терапевтический архив 2014; 86(7):24—30.
  - Волкова С. А., Самойлова О. С., Самарина И. Н. и др. Эффективность иматиниба и прогностическая значимость неудачи лечения по критериям ELN после 18 месяцев амбулаторной терапии хронического миелолейкоза. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2011; 4(2):146—151.
  - Куцев С. И. Эволюция мониторинга лечения хронического миелолейкоза. Гематология и трансфузиология 2009; 54(4):36—44.
- Остальные источники см. в References.

#### References

- Kulikov S. M., Vinogradova O. Yu., Chelysheva E. Yu. et al. Incidence of chronic myeloid leukemia in 6 regions of Russia according to the data

- of the 2009–2012 population-based study. *Terapevticheskiy arkhiv* 2014; 86(7):24–30 (in Russian).
2. Hoffmann V. S., Baccarani M., Hasford J. et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European countries. *Leukemia* 2015; 29(6):1336–1343.
  3. Jabbour E., Kantarjian H., Cortes J. Use of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: an evolving treatment paradigm. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 2015; 15(6):323–334.
  4. Volkova S. A., Samojlova O. S., Samarina I. N. et al. Efficiency of imatinib and the prognostic importance of treatment failure according to ELN criteria after 18 months in out-patient therapy of chronic myeloid leukemia. *Klinicheskaja onkogematologija. Fundamental'nye issledovanija i klinicheskaja praktika* 2011; 4(2):146–151 (in Russian).
  5. Bixby D., Talpaz M. Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25(1):7–22.
  6. Kutsev S. I., Evolution of therapy monitoring of chronic myeloid leukemia. *Gematologija i transfuziologija* 2009; 54(4):36–44 (in Russian).
  7. Hamad A., Sahli Z., E Sabban M. et al. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem Cells International* 2013; 2013:724360. doi: 10.1155/2013/724360.
  8. Marin D., Ibrahim A. R., Goldman J. M. European Treatment and Outcome Study (EUTOS) score for chronic myeloid leukemia still requires more confirmation. *Clin Oncol* 2011; 29(29):3944–3945.
  9. Yamamoto E., Fujisawa S., Hagihara M. et al. European Treatment and Outcome Study score does not predict imatinib treatment response and outcome in chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Sci* 2014; 105(1):105–109.
  10. Gromicho M., Magalhães M., Torres F. et al. Instability of mRNA expression signatures of drug transporters in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Oncology Reports* 2013; 29(2):741–750.
  11. de Lima L. T., Vivona D., Bueno C. T. et al. Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol* 2014; 31(3):851.
  12. Šmahelová J., Kaštánková I., Poláková K. M. et al. Expression of genes encoding centrosomal proteins and the humoral response against these proteins in chronic myeloid leukemia. *Oncology Reports* 2017; 37(1):547–554.
  13. Ben Hassine I., Gharbi H., Soltani I. et al. hOCT1 gene expression predict for optimal response to imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 2017; 79(4):737–745.
  14. Harrach S., Schmidt-Lauber C., Pap T. et al. MATE1 regulates cellular uptake and sensitivity to imatinib in CML patients. *Blood Cancer J* 2016; 6(9):e470.
  15. Frank O., Brors B., Fabarius A. et al. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20(8):1400–1407.
  16. San Jose-Eneriz E., Roman-Gomez J., Jimenez-Velasco A. et al. Micro RNA expression profiling in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. *Mol Cancer* 2009; 8:69.
  17. Angelini S., Soverini S., Ravegnini G. et al. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica* 2013; 98(2):193–200.
  18. Bourgne C., Janel A., Berger J. et al. Phosphorylation of spleen tyrosine kinase at tyrosine 348 (pSyk<sup>348</sup>) may be a marker of advanced phase of Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Leukemia Research* 2015; 39(3):329–334.
  19. Barreyro L., Will B., Bartholdy B. et al. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood* 2012; 120(6):1290–1298.
  20. Pellicano F., Sinclair A., Holyoake T. L. In search of CML stem cells' deadly weakness. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2011; 6(2):82–87.
  21. Zhao K., Yin L. L., Zhao D. M. et al. IL1RAP as a surface marker for leukemia stem cells is related to clinical phase of chronic myeloid leukemia patients. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(12):4787–4798.
  22. Zheng Q., Cao J., Hamad N. et al. Single nucleotide polymorphisms in apoptosis pathway are associated with response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine* 2016; 14:82; doi: 10.1186/s12967-016-0837-5.
  23. Kotagama K., Chang Y., Mangone M. miRNAs as biomarkers in chronic myelogenous leukemia. *Drug Development Research* 2015; 76(6):278–285.
  24. Nievergall E., Reynolds J., Kok C. H. et al. TGF- $\alpha$  and IL-6 plasma levels selectively identify CML patients who fail to achieve an early molecular response or progress in the first year of therapy. *Leukemia* 2016; 30(6):1263–1272.
  25. Baccarani M., Deininger M. W., Rost G. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122(6):872–884.
  26. Lavrov A. V., Chelysheva E. Y., Smirnikhina S. A. et al. Frequent variations in cancer-related genes may play prognostic role in treatment of patients with chronic myeloid leukemia. *BMC Genetics* 2016; 17(1):14. doi: 10.1186/s12863-015-0308-7.
  27. Smirnikhina S. A., Lavrov A. V., Chelysheva E. Y. et al. Whole-exome sequencing reveals potential molecular predictors of relapse after discontinuation of the targeted therapy in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia Lymphoma* 2016; 57(7):1669–1676.
  28. Lake S. L., Lyon H., Tantisira K. et al. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. *Hum Hered* 2003; 55(1):56–65.
  29. Chen E. Y., Tan C. M., Kou Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013; 14:128; doi: 10.1186/1471-2105-14-12.
  30. Kuleshov M. V., Jones M. R., Rouillard A. D. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research* 2016; 44(W1):W90-7; doi: 10.1093/nar/gkw377.
  31. Pletscher-Frankild S., Pallejà A., Tsafou K. et al. DISEASES: Text mining and data integration of disease–gene associations. *Methods* 2015; 74:83–89; doi: 10.1016/j.ymeth.2014.11.020.
  32. Huang Y., Zheng J., Hu J. D. et al. Discovery of somatic mutations in the progression of chronic myeloid leukemia by whole-exome sequencing. *Genetics and Molecular Research* 2014; 13(1):945–953.
  33. Sabri S., Keyhani M., Akbari M.T. Whole exome sequencing of chronic myeloid leukemia patients. *Iran J Public Health* 2016; 45(3):346–352.
  34. Raaijmakers J. H., Bos J. L. Specificity in Ras and Rap signaling. *J Biol Chem* 2009; 284(17):10995–10999.
  35. Bhattacharya S., Zheng H., Tzimas C. et al. Bcr-abl signals to desensitize chronic myeloid leukemia cells to IFN $\alpha$  via accelerating the degradation of its receptor. *Blood* 2011; 118(15):4179–4187.

# ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДОЛГОСРОЧНОГО СОСУДИСТОГО ДОСТУПА У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ

## Providing of the long-term vascular access in hemophilia patients

Галстян Г. М., Спирин М. В., Зозуля Н. И., Полянская Т. Ю.,  
Зоренко В. Ю.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр гематологии» Минздрава России, Москва, Российская  
Федерация

Galstyan G. M., Spirin M. V., Zozulya N. I., Polyanskaya T. Yu.,  
Zorenko V. Yu.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian  
Federation

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** В России отсутствуют рекомендации по обеспечению сосудистого доступа у больных гемофилией, хотя сосудистый доступ является необходимым условием лечения данного заболевания.

**Цель работы** — анализ обеспечения больных гемофилией долговременным сосудистым доступом.

**Материалы и методы.** Проанализированы результаты обеспечения долговременного сосудистого доступа у 11 больных гемофилией и 1 больной болезнью Виллебранда, обратившихся в службу обеспечения сосудистого доступа ФГБУ «НМИЦ гематологии» с 2014 по 2018 год.

**Результаты.** В общей сложности 12 больным установлены 17 устройств длительного центрального венозного доступа (УДЦВД): 11 периферически имплантируемых центральных венозных катетеров (ПИЦВК) и 6 портов. Семи больным установили 11 ПИЦВК, из них 4 больным с ингибиторной формой гемофилии, медиана длительности использования ПИЦВК составила 214 дней (от 7 до 464 дней), инцидентность катетерассоциированной инфекции кровотока (КАИК) составила 0,41 на 1000 катетеро-дней. Порты были установлены 6 больным — в 3 случаях через внутреннюю яремную вену, в 2 случаях через подключичную, у 1 больного гемофилией со стенозами и тромбозами вен бассейна верхней полой вены — в нижнюю полую путем пункции общей бедренной вены с выведением резервуара порта на переднюю поверхность бедра. Инцидентность катетерассоциированного тромбоза при использовании портов составила 0,15 на 1000 катетеро-дней, инцидентность КАИК — 0,15 на 1000 катетеро-дней.

**Заключение.** У больных гемофилией ПИЦВК может являться альтернативой порт-системе при обеспече-

### ABSTRACT

**Background.** There are no clinical guidelines in Russia regarding the use of central venous access devices in hemophilia despite venous access being crucial for hemophilia treatment.

**Objective.** To analyse different long-term vascular access options in hemophilia patients.

**Materials and methods.** We reviewed 12 cases (11 hemophilia patients and 1 patient with von Willebrand disease) in which long-term vascular access was established. All patients were treated in the National Research Center for Hematology between 2014 and 2018.

**Results.** In total, 17 long-term central venous devices (LTCVD) were implanted in 12 patients (11 peripherally inserted central catheters, PICCs, and 6 ports). The PICCs were implanted in 7 patients of whom 4 had FVIII inhibitors. Median PICC dwell time was 214 days (7 to 464 days); the incidence of catheter-associated bloodstream infections was 0.41 per 1000 PICC days. The ports were implanted in 6 patients (3 via internal jugular veins, 2 via subclavian veins, and 1 via femoral vein in a patient with stenosis and thrombosis of the superior vena cava system). The incidence of catheter-associated thrombosis in this group was 0.15 per 1000 port days, and the incidence of catheter-associated bloodstream infections was 0.15 per 1000 port days.

**Conclusion.** In inhibitor hemophilia patients and hemophilia patients who need intravenous therapy other than with clotting factors, PICCs are a good choice. It is necessary to estimate the demand for LTCVDs in hemophilia patients in Russia and to develop national guidelines regarding their use.

**Key words:** hemophilia, von Willebrand disease, port, peripherally inserted central catheter, long-term vascular access

нии длительного сосудистого доступа — прежде всего у больных ингибиторной формой гемофилии, а также если больные гемофилией нуждаются в ином лечении, нежели введение факторов свертывания. Необходимо определить потребность в УДЦВД больных гемофилией в Российской Федерации и разработать национальные рекомендации по их применению.

**Ключевые слова:** гемофилия, болезнь Виллебранда, порт, периферически имплантируемый центральный венозный катетер, устройство длительного сосудистого доступа

**Для цитирования:** Галстян Г. М., Спиринов М. В., Зозуля Н. И., Полянская Т. Ю., Зоренко В. Ю. Обеспечение долгосрочного сосудистого доступа у больных гемофилией. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):144–158

doi: 10.25837/HAT.2018.34..2..005

**Для корреспонденции:** Галстян Геннадий Мартинович, доктор медицинских наук, заведующий научно-клиническим отделением реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Электронная почта: gengalst@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.09.2018

Принята к печати 15.10.2018

**For citation:** Galstyan G. M., Spirin M. V., Zozulya N. I., Polyanskaya T. Yu., Zorenko V. Yu. Providing of the long-term vascular access in hemophilia patients. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):144–158 (in Russian) doi: 10.25837/HAT.2018.34..2..005

**For correspondence:** Gennadiy M. Galstyan, Ph.D., Sc.D., head of ICU department, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation. E-mail: gengalst@gmail.com

**Information about authors:**

Galstyan G. M., <http://orcid.org/0000-0001-8818-8949>;

Spirin M. V., <http://orcid.org/0000-0001-7048-060X>;

Zozulya N. I., <http://orcid.org/0000-0001-7074-0926>;

Polyanskaya T. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-4143-3094>;

Zorenko V. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-2049-850X>.

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 11 Sep 2018

Accepted 15 Oct 2018

## Введение

Гемофилия — редкое наследственное заболевание, возникающее вследствие мутации гена в X-хромосоме, вызывающей нарушение свертываемости крови, что приводит к развитию травматических и спонтанных кровотечений в мягкие ткани, суставы и внутренние органы. Лекарственное обеспечение пациентов с гемофилией с 2008 г. происходит в рамках программы централизованной закупки лекарственных средств, также называемой программой «7 нозологий» [1]. В Российской Федерации, по теоретическим расчетам, насчитывается 7095 больных гемофилией А и 1419 больных гемофилией В, т. е. всего 8514 больных [2]. Среди взрослых больных гемофилией терапия «по требованию» проводится у 59%, профилактическое лечение — у 41%, среди детей и подростков лечение «по требованию» получают только 30% больных, в то время как остальные 70% получают профилактическое лечение [3].

В России зарегистрировано 200 больных ингибиторной формой гемофилии, но с учетом тех, у кого заболевание пока не выявлено, и тех, кто не получает надлежащего лечения, реальный показатель примерно на 25% больше [3]. Согласно данным Регистра пациентов с ингибиторной формой гемофилии в Российской Федерации [3], индукция иммунной толерантности (ИИТ) проводится у 7% больных с ингибиторной фор-

мой гемофилии, терапию высокими дозами фактора VIII (SVIII) получают 9%, терапию препаратами с шунтирующим механизмом действия — 87% больных; большинство больных получает рекомбинантный активированный FVII (rFVIIa) как в режиме по требованию (66%), так и в профилактическом режиме (34%). Объемы потребления факторов свертывания, применяемых при терапии гемофилии, в 2015 г. в денежном выражении составили 7,15 млрд рублей для гемофилии А, 1,03 млрд рублей для гемофилии В, 2,79 млрд рублей для ингибиторной гемофилии и 0,19 млрд рублей для болезни Виллебранда [1]. Все эти препараты вводятся внутривенно, поэтому сосудистый доступ является необходимым условием лечения больных гемофилией.

Однако в нашей стране отсутствуют рекомендации по обеспечению долговременного сосудистого доступа у больных гемофилией. В каждом регионе России по-своему решается, а иногда и не решается, эта проблема. Речь идет не о краткосрочных центральных венозных катетерах, устанавливаемых разово у больных гемофилией для лечения или проведения оперативных вмешательств и инвазивных процедур, а об устройствах, позволяющих длительно, в течение многих месяцев или лет, внутривенно вводить препараты как в стационаре, так и в амбулаторных и домашних условиях,

т. е. проводить профилактическое лечение, лечение по требованию, домашнее лечение, индукцию иммунной толерантности. Такой долговременный сосудистый доступ должен отвечать целому ряду требований: он должен быть надежным, им должны уметь пользоваться как ухаживающие за больным родственники и медицинский персонал, так в ряде случаев и сами больные, он должен минимально ограничивать физическую активность больного, для него должны быть доступны расходные материалы, он должен быть экономически выгоден, инъекции в него должны быть безболезненны или незначительно болезненны, он должен быть максимально безопасным с точки зрения механической поломки, инфицирования, тромбирования, возможной аспирации воздуха, вытекания крови и т. д. Очевидно, что такого идеального доступа не существует. Более того, одни и те же доступы в разных возрастных группах, при разных формах гемофилии, при различном лечении могут не соответствовать тем или иным требованиям.

Цель настоящей работы — анализ обеспечения долговременным сосудистым доступом больных с наследственной или приобретенной формами гемофилии.

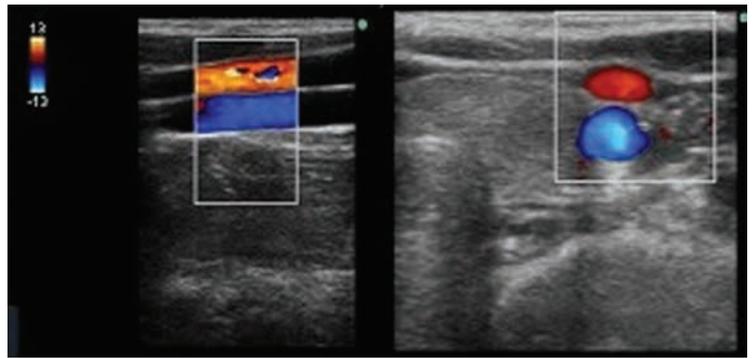
## Материалы и методы

Проанализированы результаты обеспечения долговременного сосудистого доступа у 11 больных гемофилией и 1 больной болезнью Виллебранда, обратившихся в службу обеспечения сосудистого доступа отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» с 2014 по 2018 год.

Показания к установке устройств долговременного центрального венозного доступа (УДЦВД) определяли совместно с врачами-гематологами, наблюдающими за больными. В качестве УДЦВД использовали ПИЦВК и порт-системы.

Применяли силиконовые однопросветные ПИЦВК с внешним диаметром 4Fr с клапаном Грошонг® на дистальном конце, пропускная способность 9 мл/мин (Groshong® PICC Catheter, Bard Access System). Установку ПИЦВК осуществляли в операционной, оборудованной С-дугой, в стерильных условиях. Под контролем ультразвукового исследования (УЗИ) находили вену, пригодную для пункции, — медиальную подкожную вену (*v. basilica*) либо плечевую вену (*v. brachialis*). Отношение диаметра катетера к диаметру вены не должно было превышать 45% [4].

Перед установкой ПИЦВК больным гемофилией без ингибиторов вводили дефицитный фактор свертывания (2000—3000 МЕ), чтобы достичь его активности в плазме не менее 50%; больным с ингибиторами перед катетеризацией однократно вводили rFVIIa (препарат Коагил, Генериум, Россия) в дозе 120 мкг/кг. После обработки операционного поля с помощью высокочастотного ультразвукового датчика с частотой 7—10 МГц выводили изображение вены по короткой оси (рис. 1).



**Рисунок 1.** Медиальная подкожная вена, изображения при ультразвуковом исследовании выведены по длинной и короткой осям.

**Figure 1.** Longitudinal and transverse color Doppler ultrasound showing the basilic vein.

ПИЦВК устанавливали пункционным способом по методу Сельдингера. Пункцировали вену, по игле в просвет вены вводили металлический проводник, после чего иглу удаляли и по проводнику проводили дилататор с интродьюсером. Проводник и дилататор извлекали, по интродьюсеру с расщепляемой оболочкой проводили ПИЦВК под контролем рентгеноскопии для прицельного расположения дистального конца катетера. Согласно рекомендациям FDA (Food and Drug Administration, США) [5], дистальный конец центрального катетера должен располагаться только в нижней трети верхней полой вены или у каваатриального соединения, но так, чтобы он не достигал правого предсердия. Согласно европейским рекомендациям [6—9], допустимо расположение конца катетера как в нижней трети верхней полой вены, так и в верхней трети правого предсердия. Мы располагали дистальный конец катетеров в верхней трети правого предсердия. Наружный (проксимальный) конец катетера фиксировали к коже посредством бесшовного адгезивного фиксатора StatLock (Bard Access System).

Порт-система состоит из титанового или пластикового резервуара, соединенного с силиконовым или полиуретановым рентгенконтрастным катетером. Резервуар покрыт самозалипающей силиконовой мембраной, через которую можно выполнить до 1000—2000 пункций с помощью специальной иглы Губера, имеющей несрезающий конец [10]. В 5 случаях были установлены порты Celsite (BBraun), в 1 случае — порт-система, снабженная клапаном Грошонга на дистальном конце катетера (PowerPort, Bard Access System). Установку порт-систем осуществляли в операционной, оборудованной С-дугой, в стерильных условиях. Приоритет при катетеризации отдавали одной из внутренних яремных вен, поскольку яремные вены можно пункцировать под ультразвуковым контролем, а проведение катетера через яремную вену позволяло избежать синдрома ущемления (pinch-off);

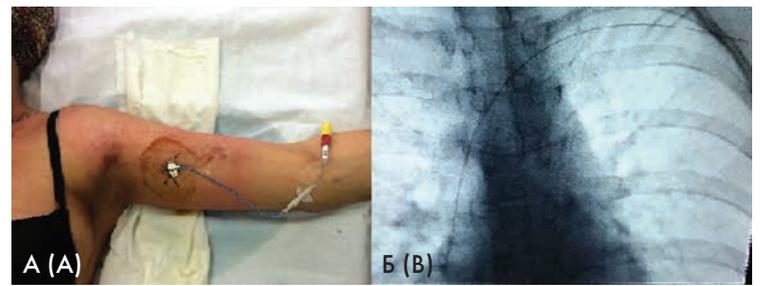
при невозможности катетеризации внутренней яремной вены пунктировали одну из подключичных вен. Дистальный конец катетера порт-системы позиционировали с помощью рентгеноскопии у каваатриального соединения либо в верхней трети правого предсердия. Резервуар порта устанавливали под кожей, на передней поверхности грудной клетки. При противопоказаниях к катетеризации вен бассейна верхней полой вены (тромбозы, стенозы, синдром верхней полой вены) пунктировали общую бедренную вену и проводили катетер, снабженный клапаном Грошона (PowerPort, Bard Access System), в нижнюю полую вену, ниже уровня почечных вен, резервуар порта располагали под кожей на передней поверхности бедра. Гемостаз при установке порт-системы обеспечивали согласно принятой схеме (табл. 1) [11]. Больной на время установки порт-системы госпитализировался на срок 3–6 суток.

Регистрировали длительность использования УДЦВД, пожелания и предпочтения пациентов при установке УДЦВД, ранние осложнения, поломку, обструкцию катетеров, катетерассоциированные тромбозы (КАТ), катетерассоциированную инфекцию кровотока (КАИК), колонизацию катетеров, инфекцию кармана.

*Статистические методы.* Использовали методы описательной статистики. Данные выражены в виде медианы (Me), диапазона значений.

## Результаты

Всего установлено 17 УДЦВД у 12 больных с врожденным и приобретенным дефицитом факторов свертывания: у 9 больных гемофилией А, в том числе 6 больных с ингибитором к FVIII, 1 больного гемофилией В, у 1 больного без гемофилии с приобретенным ингибитором к FVIII и у 1 больной с болезнью Виллебранда (табл. 2). Всего было установлено 11 ПИЦВК и 6 портов. Ни у одного из больных для длительного сосуди-



**Рисунок 2.** ПИЦВК, установленный больной болезнью Виллебранда. А — внешний вид; Б — вид при рентгеноскопии.

**Figure 2.** PICC line in a patient with von Willebrand disease. A. View of the insertion site. B. PICC on chest X-ray.

стого доступа не использовались туннелируемые катетеры.

Одиннадцать ПИЦВК установили 7 больным, из них 4 больным с ингибиторной формой гемофилии, 2 больным гемофилией А и 1 больной с болезнью Виллебранда. Трех больным с ингибиторной формой гемофилии ПИЦВК устанавливали для проведения ИИТ, одному больному — для введения rFVIIa в связи с выраженным геморрагическим синдромом. Больным гемофилией, не осложненной наличием ингибитора, ПИЦВК устанавливали для профилактического лечения и введения FVIII по требованию.

У пациентки с болезнью Виллебранда необходимость в сосудистом доступе возникла в связи с планируемой химиотерапией по поводу рака молочной железы. Плазматическая концентрация фактора Виллебранда у нее была меньше 5%, концентрация FVIII — 50%, агрегация тромбоцитов с ристомицином — 4%. Учитывая, что при проведении химиотерапии в онкологическом диспансере больная не будет получать заместительную терапию факторами свертывания, от установки порта было решено воздержаться, поскольку введение химиопрепаратов могло ослож-

**Таблица 1.** Режим обеспечения гемостаза при установке порта больным гемофилией

**Table 1.** The management of the haemostasis during port implantation in hemophilia patients

Время Time	Доза фактора Clotting factor dose	Целевая активность FVIII или FIX в плазме Target plasma FVIII or FIX activity	Время исследования Assay
До операции (1–2 ч) Preoperatively (1–2 h)	75 МЕ/кг 75 IU/kg	> 100%	Через 15–30 мин после инфузии 15–30 min postinfusion
Через 8 ч после операции Postoperatively 8 h		> 50%	До и после инфузии Preinfusion and postinfusion
1–3 дня после операции Postoperatively (day 1–3)	50 МЕ/кг каждые 12 ч 50 IU/kg every 12 h	> 50%	До и после инфузии Preinfusion and postinfusion
4–7 дней после операции Postoperatively (day 4–7)	75 МЕ/кг каждые 24 ч 50 IU/kg every 12 h	> 30%	До и после инфузии Preinfusion and postinfusion

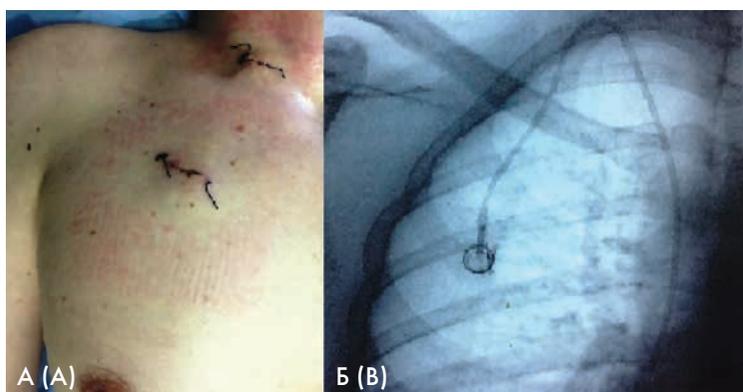
ниться гематомой в области резервуара порта; в качестве альтернативного сосудистого доступа был выбран ПИЦВК (рис. 2). Химиотерапия через ПИЦВК у нее продолжалась в течение 9,5 мес, после ее окончания катетер был удален.

Одному больному ПИЦВК устанавливались четырежды. Дважды причиной смены ПИЦВК у него явилась их обструкция, один раз — механическая поломка. При посеве кончика последнего удаленного ПИЦВК выявлена колонизация (без признаков инфекции) *Streptococcus epidermidis*. Использование ПИЦВК позволило в течение в общей сложности 3,5 года проводить больному ИИТ и избавиться от ингибитора к FVIII.

У одного больного ПИЦВК в течение 77 суток предшествовал установке порта. У другого больного после порта, прослужившего в течение 6 лет и удаленного в связи с инфицированием кармана и КАИК, был установлен ПИЦВК для введения FVIII «по требованию». В дальнейшем больной отказался от установки порта и предпочел использовать только ПИЦВК, дважды сменив их: один раз удалив случайно, другой раз — из-за механической поломки. Больной отмечает отсутствие необходимости в специальных иглах, простоту использования, несмотря на то, что у него ампутирована одна нога до средней трети бедра и он пользуется костылями.

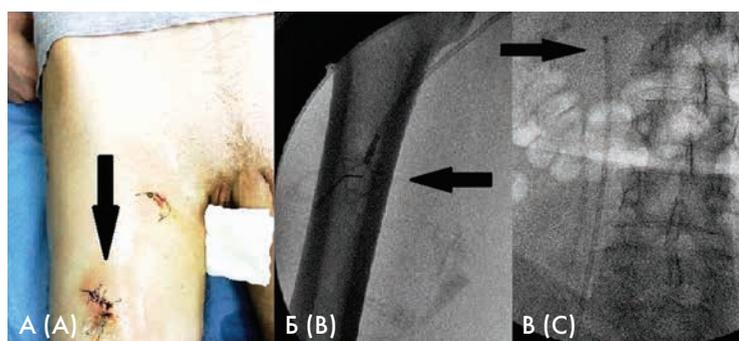
Длительность использования ПИЦВК составила от 7 до 464 дней (медиана — 214 дней). Среди ранних осложнений следует отметить 2 случая гематом на плече, в месте пункции вены, которые были небольшими и не потребовали дополнительной гемостатической терапии.

За время использования наблюдался 1 (9,1%) случай КАИК, инцидентность КАИК составила 0,41 на



**Рисунок 3.** Порт-система, установленная в правую внутреннюю яремную вену. **А** — видна нить внутрикожного шва после ушивания подкожного кармана для камеры порт-системы; **Б** — видны камера и катетер порт-системы при рентгеноскопии.

**Figure 3.** Port system implanted through the right jugular vein. **A.** Port chamber was implanted in the pocket and skin was sutured. **B.** View of the port chamber and catheter on the chest X-ray film



**Рисунок 4.** Порт-система, установленная через бедренную вену.

**А** — внешний вид с позиционированием камеры на бедре (стрелкой обозначена камера порт-системы с установленной иглой Губера); **Б, В** — вид при рентгеноскопии при установке порт-системы (**Б** — стрелкой обозначена камера порт-системы (пластиковая) с рентген-позитивной подложкой; **В** — стрелкой обозначен рентгенконтрастный конец катетера порт-системы в просвете нижней полой вены).

**Figure 4.** Port system implanted through the femoral vein. **A.** Port placement site (the arrow shows the chamber accessed with a Huber needle). **B, C.** Port system on the X-ray films. (**B.** The arrow points at the radiopaque identifier of the plastic chamber. **C.** The arrow points at the distal radiopaque tip of the catheter in the inferior vena cava.)

1000 катетеро-дней. После удаления и посева дистального конца ПИЦВК выявлен 1 случай колонизации ПИЦВК *Streptococcus epidermidis*, протекавший без каких-либо клинических проявлений (инцидентность 0,41 на 1000 катетеро-дней). Наиболее частыми поздними осложнениями при использовании ПИЦВК были механические (обструкция и поломка катетера), инцидентность которых составила 1,23 на 1000 катетеро-дней. Все ПИЦВК закрывались только 0,9% раствором натрия хлорида, без добавления раствора гепарина.

Порт-системы были установлены у 6 больных — в 3 случаях через внутреннюю яремную вену, в 2 случаях через подключичную вену (рис. 3). У одного больного гемофилией А в возрасте 40 лет для лечения геморрагического синдрома ранее выполнялись множественные катетеризации центральных вен, в том числе с помощью порта, после которых развились тромбозы и стенозы внутренних яремных, подключичных и плечеголовных вен справа и слева. У этого больного катетеризировали нижнюю полую вену путем пункции общей бедренной вены, установив порт-систему с клапаном Грошонга на дистальном конце катетера и выведя резервуар порта на переднюю поверхность бедра (рис. 4). Наличие клапана Грошонга предотвращало заброс крови в порт-систему при принятии больным вертикального положения и позволяло закрывать порт раствором 0,9% натрия хлорида без гепарина.

Частота КАТ при использовании портов среди больных гемофилией составила 16,6% (1 случай через 2 года и 2 месяца после установки порта), инцидентность КАТ — 0,15 на 1000 катетеро-дней. Наблюдался

**Таблица 2.** УДЦВД, установленные у больных гемофилией и болезнью Виллебранда  
**Table 2.** LTCVD in patients with hemophilia and Willebrand disease

№	ФИО Patient	Возраст, пол Age, gender	Диагноз Diagnosis	Цель Aim of LTCVD insertion	УДЦВД Type of LTCVD	Вена Vein	Осложнения Complications	Срок службы, дней Dwell time, days	Посевы Blood cultures
1	ЕАА EAA	37, м 37, M	ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	Порт Port	v jugularis int dext	Б/о No complications	987 — н. в. 987 - up till now	
2	КРЮ KRYu	44 м 44, M	ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	Порт Port	v jugularis int dext	Б/о No complications	91 — н. в. 91 - up till now	
3	КАЯ KAY	52, м 52, M	ГВ Hemophilia B	Введение FIX FIX administration	Порт Port	v subclavia dext	Б/о No complications	2372 — н. в. 2372 - up till now	
4	МДА MDA	58, м 58 M	ГА + ингибитор к FVIII Inhibitor Hemophilia A	ИИТ ITI	ПИЦВК PICC	v cephalica dext	Обструкция Obstruction	360	
		59, м 59, M	ГА + ингибитор к FVIII Inhibitor Hemophilia A	ИИТ ITI	ПИЦВК PICC	v basilica dext	Поломка Catheter fracture	214	
		59, м 59, M	ГА + ингибитор к FVIII Inhibitor Hemophilia A	ИИТ ITI	ПИЦВК PICC	v brachialis sin	Обструкция Obstruction	464	
		60, м 60, M	ГА + ингибитор к FVIII Inhibitor Hemophilia A	ИИТ ITI	ПИЦВК PICC	v brachialis dext	Колонизация Catheter colonisation	190	Streptococcus epidermidis
5	ССН SSN	45, ж 45, F	БВ Willebrand disease	ХТ Chemotherapy	ПИЦВК PICC	v basilica sin	Гематома Hematoma	287	
6	ТСВ TSV	37, м 37, M	ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	ПИЦВК PICC	v brachialis dext	Обструкция Obstruction	77	
37, м 37, M		ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	Порт Port	v jugularis int dext	КАТ CAT	803		
40, м 40, M		ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	Порт Port	v femoralis sin	Гематома Hematoma	99 — н. в. 99 - up till now.		
9	ТИС TIS	72, м 72, M	Ингибитор к FVIII rFVIIa administration	Введение rFVIIa administration	ПИЦВК PICC	v brachialis dext	Гематома Hematoma	7	
10	ХАР CAR	45, м 45, M	ГА + ингибитор к FVIII Inhibitor Hemophilia A	ИИТ ITI	ПИЦВК PICC	v basilica sin	Б/о No complications	364	

**Таблица 2 (окончание).** УДЦВД, установленные у больных гемофилией и болезнью Виллебранда  
**Table 2.** LTCVD in patients with hemophilia and Willebrand disease

№	ФИО Patient	Возраст, пол Age, gender	Диагноз Diagnosis	Цель Aim of LTCVD insertion	УДЦВД Type of LTCVD	Вена Vein	Осложнения Complications	Срок службы, дней Dwell time, days	Посевы Blood cultures
11	ХАА КАА	42, м 42, M	ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	Порт Port	v subclavia dext	КАИК, инфекция кармана CABS1, pocket infection	2160	<i>Staphylococcus aureus</i>
			ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	ПИЦВК PICC	v basilica sin	КАИК CABS1	93	<i>Kebstiella oxytoca</i>
		ГА Hemophilia A	Введение FVIII FVIII administration	ПИЦВК PICC	v basilica dext	Случайно удален Removed accidentally	14		
12	КАА	36, м 36, M	ГА+ ингибитор к FVIII Inhibitor Hemophilia A	ИИТ ITI	ПИЦВК PICC	v brachialis dext	Б/о No complications	360	

БВ — болезнь Виллебранда; б/о — без осложнений; ГА — гемофилия А; ИИТ — индукция иммунной толерантности; КАИК — катетерассоциированная инфекция кровотока; КАТ — катетерассоциированный тромбоз; н. в. — используется по настоящее время; ПИЦВК — периферически имплантируемый центральный венозный катетер; УДЦВД — устройство длительного центрального венозного доступа.  
 ITI — immune tolerance induction; CABS1 — catheter-associated bloodstream infections; CAT — catheter-associated thrombosis; PICC — peripherally inserted central catheter; LTCVD — long-term central venous device.

1 случай КАИК и инфекции кармана порта, вызванный *Staphylococcus aureus* (16,6%), через 6 лет после установки порт-системы, инцидентность 0,15 на 1000 катетеро-дней. В связи с КАТ и инфекцией были удалены 2 из 6 портов, остальные используются по настоящее время. Общее время использования порт-систем в настоящий момент составило 6512 дней, удалены лишь 2 из 6 портов на 2160-й и 803-й дни использования.

### Обсуждение

Для долговременного лечения больных гемофилией могут быть использованы периферический доступ [12], артериовенозная фистула (АВФ) [13–17], а также УДЦВД, к которым относят туннелируемые центральные венозные катетеры [18–20], периферически имплантируемые центральные венозные катетеры (ПИЦВК) [18, 19, 21] и полностью имплантируемые порт-системы (порты) [11, 18–20, 22–24]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки (табл. 3).

Метод выбора при обеспечении сосудистого доступа у пациентов с гемофилией — пункция периферических вен. Она не связана с большим количеством осложнений, требуются иглы малого калибра (23–25 G), а короткое время инфузии достаточно для введения концентратов факторов. Обычно пунктируют вены руки с помощью иглы-бабочки [25]. Повторные частые вене-пункции могут осложниться гематомами.

Однако у некоторых пациентов использование периферического венозного доступа невозможно из-за малого размера вен, плохой переносимости повторных вене-пункций, необходимости частого использования сосудистого доступа. Причинами отказа от использования периферического доступа могут явиться возраст пациентов и частые кровотечения [12, 19]. По данным литературы, невозможность использовать периферический венозный доступ с переходом на УДЦВД были отмечены у 148 (27%) из 547 больных гемофилией детей [18]. Из 56 детей с гемофилией в возрасте от 6 месяцев до 2,1 года (медиана — 1,3 года), которым проводилась первичная профилактика, 21 (37,5%) ребенку потребовалась установка УДЦВД [22]. Таким образом, от четверти до трети больных гемофилией нуждаются в УДЦВД.

По сравнению с периферическим венозным доступом применение УДЦВД значительно удорожает лечение больных гемофилией: общая стоимость госпитализации 155 детей, которых лечили с использованием периферического доступа, и 155 детей с УДЦВД составила 25 389 и 47 200 долларов США соответственно ( $p = 0,02$ ) [26]. При использовании УДЦВД чаще, по сравнению с периферическим венозным доступом, наблюдались инфекции (29 и 17% случаев соответственно,  $p = 0,01$ , относительный риск (ОР) 2,09 (95% ДИ 1,17–3,71,  $p = 0,01$ )) и тромбозы (6 и 1% случаев соответственно;  $p = 0,05$ , ОР 4,45 (95% ДИ 0,94–21,20,  $p = 0,06$ )) [26].

**Таблица 3.** Преимущества и недостатки различных сосудистых доступов у больных гемофилией  
**Table 3.** Advantages and disadvantages of different types of vascular accesses in hemophilia patients

Тип Type	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages
<b>Инъекции в периферические вены</b> <i>Injections in peripheral veins</i>	<b>Нет установленного устройства</b> <b>Не требуется хирургическое вмешательство</b> <b>Низкий риск инфицирования</b> <b>Нет необходимости в специальном обслуживании</b> <i>No external devices</i> <i>No surgery required</i> <i>Low risk of infections</i> <i>No special care required</i>	<b>Не всегда можно быстро пунктировать вену, особенно в домашних условиях</b> <b>Возможна гематома в месте инъекции</b> <i>Low likelihood of successful access at first attempt, especially at home</i> <i>Possible hematoma at site of injection</i>
<b>АВФ</b> <i>Arteriovenous fistula</i>	<b>Нет установленного устройства</b> <b>Низкий риск инфицирования</b> <b>Не нужны специальные иглы</b> <b>Длительное использование</b> <i>No external devices</i> <i>Low risk of infections</i> <i>Special needles not required</i> <i>Long duration</i>	<b>Требуется хирургическое вмешательство при установке</b> <b>Требуется время для «созревания»</b> <b>Ограничение нагрузки на руку</b> <b>Обучение ухаживающих лиц, персонала</b> <i>Surgical insertion</i> <i>Time for maturation required</i> <i>Limit physical activities of the arm</i> <i>Specific training needed</i>
<b>ПИЦВК</b> <i>PICC</i>	<b>Нет риска пневмоторакса, гемоторакса при установке</b> <b>Не нужны специальные иглы</b> <b>Можно использовать сразу после установки</b> <b>Не требуются концентраты факторов свертывания при установке</b> <b>Нет прокола кожи при инъекции</b> <i>No risk of pneumothorax and hemothorax</i> <i>Special needles not required</i> <i>Immediate use</i> <i>No factor concentrates required</i> <i>No skin puncture</i>	<b>Требуется ультразвуковая навигация, рентгеновский контроль при установке</b> <b>Ограничение подвижности руки</b> <b>Мешает передвижению на костылях</b> <b>Риск инфицирования</b> <b>Ограниченная длительность использования</b> <b>Ограничения при купании, приеме душа</b> <b>Риск дислокации</b> <i>Ultrasound and X-ray inspections required during insertion</i> <i>Limit physical activities of the arm</i> <i>Complicates the movement on crutches</i> <i>Risk of infections</i> <i>Limited duration</i> <i>Need protective dressings during bathing or swimming</i> <i>Risk of displacement</i>
<b>Туннелируемые катетеры</b> <i>Tunneled catheters</i>	<b>Не требуется хирургическое вмешательство</b> <b>Не нужны специальные иглы, обучение</b> <b>Можно использовать сразу после установки</b> <b>Нет прокола кожи при инъекции</b> <i>No surgery required</i> <i>Special needles not required</i> <i>Immediate use</i> <i>No skin puncture</i>	<b>Риск пневмоторакса, гемоторакса при установке</b> <b>Риск инфицирования</b> <b>Ограниченная длительность использования</b> <b>Виден через легкую одежду</b> <b>Может легко повредиться</b> <b>Риск дислокации при физической активности, спонтанно</b> <b>Могут дислоцироваться по мере роста ребенка</b> <b>Ограничения при купании, приеме душа</b> <b>Риск тромбоза</b> <i>Risk of pneumothorax and hemothorax</i> <i>Risk of infections</i> <i>Limited duration</i> <i>Visible through clothes</i> <i>Can be damaged</i> <i>Risk of displacement</i> <i>Risk of dislodgement in children due to their growth</i> <i>Need protective dressings during bathing or swimming</i> <i>Risk of thrombosis</i>

**Таблица 3 (окончание).** Преимущества и недостатки различных сосудистых доступов у больных гемофилией  
**Table 3.** Advantages and disadvantages of different types of vascular accesses in hemophilia patients

Тип Type	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages
<b>Полностью имплантируемые порт-системы</b> <i>Fully implantable port systems</i>	<p>Не нужны специальные покрытия при купании                      Имеют преимущества у детей младше 2 лет, у которых наружные катетеры по мере роста и вытягивания ребенка могут дислоцироваться                      Позволяют вести активный образ жизни, принимать душ, плавать без специальной наклейки                      Не требуют ежедневного ухода                      Косметический эффект                      Длительное использование (&gt; 1 года)                      Меньше риск инфицирования</p> <p><i>No protective dressings during bathing or swimming                      Are preferable for children younger than 2 years, in whom external catheters can dislodge due to physical growth                      No limitation for physical activities, bathing, swimming                      Less frequent care                      Cosmetic effect                      Long duration (&gt; 1 year)                      Low risk of infections</i></p>	<p>Требуется хирургическое вмешательство для установки                      Стоимость катетера, концентратов факторов при установке                      Риск тромбозов                      Необходимость прокола кожи                      Специальное обучение персонала, родственников, пациента                      Специальные иглы                      Возможна эрозия кожи над резервуаром</p> <p><i>Surgical insertion                      Cost of concentrates of factors for implantation                      Risk of thrombosis                      Skin puncture required                      Specific training needed                      Proper needle required                      Possible skin erosion after prolonged use</i></p>

В наших наблюдениях длительный сосудистый доступ обеспечивали с помощью либо порт-систем, либо ПИЦВК. В литературе описывают применение у больных гемофилией также артериовенозных фистул (АВФ), которые мы не использовали в нашей практике.

Для формирования АВФ используют недоминантную руку. Перед процедурой с помощью ультразвукового исследования (УЗИ) проверяют проходимость и диаметр медалльной и латеральной подкожных вен, плечевой вены [13]. Медалльная или латеральная подкожная вена диаметром менее 2 мм не используются, поскольку калибр этих вен недостаточен для «созревания» АВФ [17]. Гемостаз перед операцией обеспечивают введением концентратов FVIII или FIX болюсом 70–100 МЕ/кг таким образом, чтобы добиться активности дефицитного фактора свертывания в плазме не менее 100%. У больных с ингибитором применяют шунтирующие препараты (анитиингибиторный коагулянтный комплекс, 80–100 ед/кг, rFVIIa, 120 мкг/кг). Выполняется формирование АВФ по типу «конец в бок» в условиях общей или местной анестезии. После операции уровень дефицитного фактора поддерживают не менее 50% в 1–3-й дни, не менее 30% в 4–7-й дни. У пациентов с наличием ингибитора вводят rFVIIa каждые 2–3 ч в дозе 90–120 мкг/кг в течение первых 24 ч и затем каждые 4–6 ч до 7-го дня либо вводят анитиингибиторный коагулянтный комплекс в дозе 80–100 ед/кг каждые 8 ч первые 3 дня, а затем каждые 12 ч. Для предупреждения тромбоза на фоне заместительной терапии факторами свертывания вводят гепарин в дозе 5 ед/кг/ч в течение 3 дней у больных с ингибиторами и без ингибиторов. Швы снимают

через 7–10 дней. «Созревание» АВФ определяется по достаточной дилатации вены и артериализации кровотока, что происходит в среднем в течение 3 недель. Для облегчения пункции АВФ выше может быть наложен жгут на руку, чтобы достичь расширения вены [15].

В литературе суммарно в 4 работах [13, 14, 17, 27] описан 101 больной гемофилией с АВФ. Не было ни одного случая инфицирования АВФ при сроке наблюдения до 4 лет. Возраст больных, при котором была установлена АВФ, колебался от 8 мес до 27 лет. Проходимость АВФ в первый год использования составляла 100%, спустя 3 года — 80% и спустя 4 года — 75% [17].

Значительно чаще, чем АВФ, для обеспечения долговременного сосудистого доступа используют УДЦВД. Показанием к установке УДЦВД является потребность в регулярном долговременном сосудистом доступе у пациентов с гемофилией, у которых невозможно использовать периферический венозный доступ из-за малого диаметра вен, отсутствия видимых периферических вен; у детей, которые плохо переносят повторные венопункции. Наиболее частые причины установки УДЦВД у больных гемофилией — индукция иммунной толерантности (34,9%), трудный венозный доступ (31,8%), профилактическая терапия (29,1%) [28]. Все УДЦВД можно разделить на три вида: ПИЦВК, туннелируемые катетеры Хикмана, Леонарда или Бровиака и полностью имплантируемые порт-системы (порты). Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки (табл. 3). При выборе того или иного УДЦВД принимаются во внимание возраст пациента, частота кровотечений, проводимое лечение [28].

В настоящей работе не использовались у пациентов с гемофилией туннелируемые катетеры (катетеры Бровиака, Хикмана, Леонарда), хотя они широко применяются в НМИЦ гематологии при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Туннелированные катетеры изготавливают из биосовместимого рентгенконтрастного силикона или полиуретана, что обеспечивает их биологическую инертность, предотвращает образование фибрина и окклюзию катетера. Часть катетера, предназначенная для нахождения в подкожном туннеле, оснащена дакроновой манжетой, врастающей в окружающие ткани с обеспечением его фиксации и создающей химический и физический барьеры для распространения инфекции. Туннелированные катетеры бывают однопросветными, двухпросветными или трехпросветными, имеют на проксимальном открытом конце Луэр Лок коннектор и зажимы. Дистальный конец туннелируемого катетера может быть либо открытым, либо оснащенным клапаном Грошонга. Туннелируемый ЦВК может быть установлен во внутреннюю яремную вену, подключичную вену, если позволяет размер вены — в наружную яремную вену.

Осложнения, возникающие при использовании туннелируемых катетеров, могут быть присущи как всем центральным венозным катетерам (пневмоторакс, воздушная эмболия, кровотечение, гематома, нарушения ритма сердца, перфорация сосуда, тромбоэмболия, повреждение грудного лимфатического протока, окклюзия катетера, тромбоз, КАИК и др.), так и только туннелируемым катетерам (аллергическая реакция на ионы серебра или коллаген, входящие в покрытие манжеты, эрозия манжеты через кожу, синдром заземления, инфекция туннеля катетера, дислокация катетера). Применение катетеров Бровиака у 6 детей, больных гемофилией (из них 5 — с наличием ингибиторов), в течение от 71 до 2064 дней (медиана 1163 дня) не выявило побочных эффектов [29]. Все катетеры снабжались клапаном-коннектором, предупреждающим обратный заброс крови и аспирацию воздуха при использовании. Авторы отмечают простоту использования, легкость домашнего ухода за катетером, отсутствие проколов кожи, комплаентность опекунов (родственников) больного [29]. В то же время туннелируемые катетеры используют значительно реже, чем порты. В метаанализе [23], включавшем 2704 больных гемофилией, которым было установлено 2973 УДЦВД, на катетеры Бровиака приходилось 12,6% случаев, на катетеры Хикмана — всего 6,6%. Большие размеры этих катетеров допускают большие объемы инфузий, что необходимо при трансплантации, но, как правило, не требуется у пациентов с гемофилией. Открытые проксимальные концы, выходящие на кожу, с одной стороны, повышают риск инфицирования, а с другой стороны, при их использовании в домашних условиях возможны обратный заброс крови и аспирация возду-

ха, поэтому дополнительно требуется применение специальных клапанов-коннекторов.

Считается, что для пациентов с гемофилией без ингибиторов к факторам свертывания наилучшим вариантом УДЦВД является порт-система как наименее подверженная инфекционным осложнениям [19, 24]. До 76—77% больных гемофилией, нуждающихся в УДЦВД, имеют порт [18, 28]. В метаанализе [23], включавшем 2704 больных гемофилией, которым было установлено 2973 УДЦВД, на порты приходилось 67,5% случаев. В нашем исследовании порт-система использовалась у 6 из 7 больных гемофилией без ингибиторов. ПИЦВК был установлен лишь 1 больному, еще одному больному ПИЦВК был имплантирован после инфицирования порта.

У пациентов с ингибиторами к факторам свертывания применение портов может быть предпочтительным, однако при принятии решения о выборе между портом и внешним УДЦВД необходимо принимать во внимание такие факторы, как титр ингибитора, риск гематомы при установке порта, возможность инфицирования. Несмотря на гемостатическую терапию шунтирующими препаратами, имплантация порт-систем у больных с ингибиторами нередко осложняется гематомами. Гематомы вокруг порта были выявлены у 7 из 34 больных гемофилией без ингибитора и у 4 из 7 больных с наличием ингибиторов [30]. Согласно данным исследования, проведенного в 17 центрах США, при установке ЦВК у 75 больных ингибиторной гемофилией для проведения индукции иммунной толерантности гематомы вокруг центральных катетеров отмечены в 28—42% случаев [31]. Согласно испанским данным, у 40% больных с ингибиторной гемофилией катетеризация центральных вен осложнялась гематомами [32]. В новозеландском исследовании при установке портов кровотечение отмечено у 3 из 4 больных с ингибиторной формой гемофилии [33].

Поэтому у пациентов с высоким титром ингибиторов к факторам свертывания безопасными являются ПИЦВК. Их преимуществом является простота использования, недостатком — риск инфицирования. В литературе имеются сообщения о применении ПИЦВК у больных ингибиторной формой гемофилии [21]. В одном из них описывается установка ПИЦВК двум больным ингибиторной формой гемофилии после предварительного введения антиингибиторного коагулянтного комплекса в дозе 75 МЕ/кг. У одного из больных после катетеризации развилось кровотечение, потребовавшее дополнительного введения rFVIIa. Дальнейшее использование катетеров протекало без осложнений [21].

В нашем исследовании всем больным с наличием ингибиторов были установлены ПИЦВК. Их установка не требовала дополнительного введения шунтирующих препаратов, госпитализации больных, что значительно удешевляло саму процедуру. Однако и

ряд больных гемофилией без наличия ингибиторов предпочитал ПИЦВК портам, поскольку ими легче пользоваться, не нужны специальные навыки в отличие от портов, пользоваться которыми (вколоть иглу в резервуар, промыть) нередко не могут не только сами пациенты, но и медицинский персонал, не нужны специальные иглы Губера. Более того, опыт работы показал, что есть еще одна область применения ПИЦВК у больных с врожденными коагулопатиями — при необходимости лечения, не связанного с введением факторов свертывания, например химиотерапии при онкологических заболеваниях. Пункция резервуара порта без введения факторов свертывания у этой категории больных может привести к гематоме, поэтому установка ПИЦВК явилась хорошей альтернативой при проведении химиотерапии в течение достаточно длительного времени.

Важной проблемой явилось промывание и закрытие УДЦВД (табл. 4). Промывание катетера осуществляется 0,9% раствором натрия хлорида и предназначено для очищения его просвета. Объем раствора для промывания должен быть адекватным, чтобы удалить депозиты фибрина из катетера и из резервуара порта. При промывании болюсно вводят раствор шприцем объемом не менее 10 мл. Шприцы меньшего объема создают высокое давление, что может привести к повреждению катетеров. От техники промывания зависят поток жидкости в просвете

катетера и эффективность промывания просвета катетера. Непрерывное введение раствора, создающее ламинарный поток, является менее эффективным, чем прерывистое пульсирующее введение жидкости, создающее турбулентный поток [34].

Закрытие катетера замком представляет собой введение ограниченного объема жидкости на период времени, когда катетер не используется, для предупреждения тромбирования и колонизации просвета катетера. Традиционно в качестве антикоагулянта для закрытия используют раствор гепарина (100 ед/мл) [35]. Объем закрытия должен быть равен примерно двум объемам катетера, т. е. 3—5 мл для катетеров Хикмана или Бровиака и 4—6 мл для портов [19]. При использовании «гепариновых замков» для закрытия катетеров у больных гемофилией рекомендуется аспирировать раствор с гепарином перед началом использования катетера [19]. Больным, получающим профилактику через день, не требуется предварительной аспирации гепарина, однако больным с массой тела менее 10 кг, получающим профилактику каждый день, и больным с наличием ингибиторов она необходима. Применение катетеров с клапаном Грошонга, а также катетеров, снабженных устройствами Clampless, Safsite, позволяет закрывать катетеры без гепарина, заполнив их только раствором хлорида натрия. В ряде центров предпочитают не использовать раствор гепарина для закрытия УДЦВД у больных гемофилией. В многоцентровом исследовании [36] порты у больных гемофилией в 21 центре (215 детей, 310 портов) закрывали раствором гепарина (100 ед/мл), в трех центрах (16 детей, 31 порт) — только 0,9% раствором хлорида натрия. Разницы в частоте окклюзии катетеров в группе, в которой порты закрывали с гепарином (38 из 310 портов — 12%), и в группе, где порты закрывали без гепарина (1 из 31 порта — 3%), не выявлено ( $p = 0,230$ ). У наблюдаемых нами больных закрытие катетеров проводилось 0,9% раствором хлорида натрия без добавления гепарина.

В результате в наблюдаемой нами когорте больных было 2 случая окклюзии ПИЦВК, явившихся причиной удаления катетеров. В то же время применение порт-системы с клапаном Грошонга на дистальном конце катетера при установке катетера в бедренную вену позволило избежать заброса крови при вертикальном положении больного, что неизбежно наблюдается при применении обычных катетеров, даже при закрытии их только 0,9% раствором NaCl, без антикоагулянтов.

Другой, хоть и редко встречающийся проблемой, ограничивающей применение УДЦВД, являются КАТ. По данным литературы, при использовании УДЦВД у больных гемофилией КАТ имеют инцидентность 0,056 (95% ДИ 0,016—0,196) на 1000 катетеро-дней и являются причиной удаления УДЦВД в 4,1% случаев [23]. В нашем исследовании КАТ явился причиной удале-

**Таблица 4.** Режимы промывания и закрытия катетеров [35]  
**Table 4.** Flushing and locking regimen [35]

Промывание катетера <i>Catheter flushing</i>	
<b>Введение препаратов</b> <i>Drug administration</i>	<b>Промывать УДЦВД необходимо болюсно до и после введения лекарственных препаратов и компонентов крови 10 мл 0,9% раствора NaCl</b> <i>Flush with 10 mL normal saline before and after administration of drugs and blood components</i>
Закрытие катетера <i>Catheter locking</i>	
<b>Объем</b> <i>Volume</i>	<b>- 1,5 мл для ПИЦВК, туннелируемых катетеров с небольшим (<math>\leq 1</math> мм) внутренним диаметром</b> <b>- 2,5 мл для туннелируемых катетеров с большим (<math>\geq 1</math> мм) внутренним диаметром</b> <b>- 2,5 мл для портов</b> <i>- 1.5 mL for PICCs, small-bore tunnelled catheters (<math>1 \leq</math> mm ID)</i> <i>- 2.5 mL for large-bore tunnelled catheters (<math>1 \geq</math> mm ID)</i> <i>- 2.5 mL for ports</i>
<b>Режимы</b> <i>Regimen</i>	<b>Еженедельно для туннелируемых катетеров и ПИЦВК</b> <b>Каждые 6—8 недель для порт-систем</b> <i>Weekly in tunnelled catheters and PICCs</i> <i>q6w–q8w in ports</i>

ния порта в 1 случае (частота КАТ 16,6%, инцидентность 0,15 на 1000 катетеро-дней). У этого больного гемофилией А (ТСВ, табл. 3) к 37-му году жизни после множества катетеризаций краткосрочными центральными венозными катетерами развились стенозы левой внутренней яремной, левой подключичной и левой плечевого вен. Ему была установлена порт-система в правую внутреннюю яремную вену, которая через 2,2 года была удалена в связи с развитием КАТ правой внутренней яремной и правой плечевого вен. Сосудистый доступ у него был обеспечен имплантацией порт-системы через бедренную вену.

КАТ нередко протекают бессимптомно. У 13 (81%) из 16 больных гемофилией, у которых центральные венозные катетеры использовались на протяжении от 2 месяцев до 6,7 года (в среднем 1 год), при венографии были обнаружены катетерассоциированные тромбозы глубоких вен [37]. Это больше, чем в исследовании Journeuse et al. [38], по данным которого частота КАТ при гемофилии составляла 53%. У значительной части больных в обоих исследованиях тромбозы протекали бессимптомно [37, 38]. Клинически КАТ проявляются болями в руке, болезненностью при пальпации, отеком, эритемой, локальной гипертермией, появлением коллатеральных сосудов. Риск тромбоза у больных с катетером Хикмана в 5 раз выше, чем у больных с порт-системой [39]. Риск КАТ растет с увеличением размера катетера [40].

В наших наблюдениях основной причиной КАТ было введение больших доз концентрата FVIII, после чего пиковая активность FVIII в плазме часто превышала 200%. Не было выявлено ни одного случая наследственной тромбофилии у больных гемофилией. Гемофилия и тромбофилия относятся к орфанным заболеваниям, сочетание этих двух патологий хотя и редко, но возможно. Описаны различные мутации, ассоциированные с тромбофилией, которые находят у пациентов с гемофилией: мутация FV Лейден, мутация фактора ПС20210А, G 20210А мутация в гене протромбина, гипергомоцистеинемия, дефицит протеина С, протеина S, антипротромбина III и др. [41, 42]. Сочетание с тромбофилией ослабляет выраженность геморрагического синдрома при гемофилии. Полиморфизм генов, ассоциированных с тромбофилией, встречается среди пациентов с гемофилией в 3–6% случаев, т. е. с той же частотой, что и в общей популяции [43]. Поэтому рутинный скрининг на тромбофилию больных гемофилией до установки УДЦВД не оправдан и не гарантирует, что КАТ не разовьется.

Более частым осложнением при использовании УДЦВД явилась катетерассоциированная инфекция. В метаанализе, включавшем 48 исследований, проведенных у 2704 пациентов с гемофилией, которым были установлены 2973 УДЦВД, было зарегистрировано 1190 инфекционных осложнений, или 0,66 на 1000 катетеро-дней (95% ДИ 0,44–0,97 на 1000 кате-

теро-дней). Среднее время до первой инфекции, ассоциированной с УДЦВД, составляло 295 дней (95% ДИ 181–479 дней) [23]. В 70% случаев причиной удаления УДЦВД у пациентов с гемофилией являлась инфекция [23].

В финском исследовании [44], включавшем 58 пациентов с гемофилией, которым были установлены 106 УДЦВД, частота КАИК составила 17 (16%) случаев, инцидентность — 0,12 на 1000 катетеро-дней, из-за инфекции были удалены 12 (11,3%) из 106 УДЦВД. Порты инфицируются значительно реже, чем другие УДЦВД. Инцидентность инфекции, ассоциированной с УДЦВД, при использовании портов составила лишь 31% от инцидентности инфекции при использовании внешних катетеров, т. е. почти в 3 раза ниже [23].

В нашем исследовании при использовании ПИЦВК частота КАИК составила 9,1%, а инцидентность — 0,41 на 1000 катетеро-дней, аналогичные показатели при использовании порт-систем составляли 16,6% и 0,15 на 1000 катетеро-дней. Низкой частоте КАИК при использовании ПИЦВК есть несколько объяснений. Рука меньше колонизируется патогенами, чем передняя стенка грудной клетки и шея [45]: на коже руки выявляется в среднем 5–10 колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий/см<sup>2</sup>, а на коже шеи и груди — 1000–10 000 КОЕ/см<sup>2</sup>, что обусловлено разной температурой кожи на различных участках тела [46]. Кроме того, на шее и груди сложнее соблюдать гигиену вследствие возможного затекания секрета из носа, рта, а у мужчин вследствие роста волос на шее и наличия бороды, необходимости бритья [47]. Кроме того, ПИЦВК почти в два раза длиннее обычных центральных катетеров, поэтому вероятность того, что при попадании на внешнюю поверхность катетера микроорганизмы достигнут его дистального конца, меньше.

Фактором риска инфекции является возраст пациентов с гемофилией. Согласно данным метаанализа, риск катетерассоциированной инфекции у детей младше 6 лет почти в 2 раза выше, чем у детей более старшего возраста. Этому способствуют несколько факторов: доступ к венам малого диаметра у маленьких детей более труден, у них сложнее поддерживать стерильность вокруг катетера, кроме того, у маленьких детей чаще применяют анестетический крем, который создает плохо смываемую липидную пленку [23].

Независимым фактором риска инфекционных осложнений при использовании УДЦВД является наличие у больных гемофилией ингибиторов [12, 23]. Коэффициент заболеваемости инфекционными осложнениями, ассоциированными с УДЦВД, среди пациентов с наличием ингибиторов составляет 1,67 (95% ДИ 1,15–2,43) КАИК [23]. Объясняют это тем, что при наличии ингибиторов УДЦВД чаще используются, чем при профилактике, кроме того, предрасполагают к инфекции и кровоизлияния, образующи-

еся вокруг порта после установки порта и инъекций у больных с ингибиторами [23, 24]. Инцидентность инфекции у пациентов с наличием ингибиторов составила 5,92 на 1000 койко-дней, у пациентов без ингибиторов — 0,99 на 1000 койко-дней ( $p = 0,0001$ ), хотя частота инфекционных осложнений была близкой — 73 и 63% [24]. У пациентов с ингибиторной гемофилией раньше ( $p = 0,006$ ) и чаще ( $p = 0,00001$ ) развивалась катетерассоциированная инфекция, и у них раньше удаляли УДЦВД вследствие инфекции ( $p = 0,05$ ), чем у больных гемофилией без ингибиторов [24].

Важная роль в предупреждении инфекционных осложнений отводится правильному уходу за УДЦВД. В исследовании Khaig et al. [36] обследовали 240 детей в возрасте от 0,02 до 7,94 года (медиана 1,31 года), больных гемофилией, у которых были установлены 352 порта на общий срок 2 156 988 катетеро-дней у пациентов без ингибиторов и 183 852 катетеро-дня у пациентов с ингибиторами (медиана 2,94 года). Сравнивали частоту ассоциированных с портами инфекционных осложнений в зависимости от тактики ухода за портами: 1) группа асептической техники, при которой избегали прикосновения к устройству ( $n = 46$ ); 2) группа стерильной техники, где применяли стерильные перчатки, халаты и стерильное поле, правила асептики ( $n = 131$ ); 3) полностью стерильная асептическая техника, халаты, маски, перчатки ( $n = 16$ ). В этом исследовании из-за инфекции были удалены 34% (118 из 352) портов и не было выявлено различий в частоте инфекционных осложнений между тремя видами техники ухода за катетерами. Единственным фактором, повышающим частоту инфекционных осложнений, было наличие у больных ингибиторов [36].

Рекомендуется соблюдать правила асептики. Обязательно мытье рук (использование перчаток не заменяет мытья рук). Руки необходимо мыть с раствором антисептика. Чтобы уменьшить боль при проколе кожи, используют анестетический крем Эмла, содержащий лидокаин и прокаин, который сохраняет анальгетическое действие до 2 ч после удаления, однако после него остается остаточная жировая пленка, которая может явиться средой для роста бактерий. Поэтому место нанесения крема надо мыть с мылом. Для обработки кожи используют 10% повидон или 2% хлоргексидин, последний является предпочтительным [19].

При выявлении КАИК нами предпринимались попытки антибактериальной терапии. В то же время необходимо удалять УДЦВД, если результаты посева крови остаются положительными после соответствующего курса антибактериальной терапии, при инфекции, вызываемой грибами, повторных инфекциях, вызываемых теми же микроорганизмами после успешной антибактериальной терапии, туннельной и карманной инфекции и эрозии кожи над портом, а также бакте-

риемии, не разрешающейся в течение 48—72 ч на фоне антибактериальной терапии.

Таким образом, у больных гемофилией ПИЦВК может являться альтернативой порт-системе при обеспечении длительного сосудистого доступа, прежде всего у больных ингибиторной формой гемофилии, в случаях, когда невозможно обучить больного и ухаживающих за ним лиц пользоваться порт-системой, при доступности специальных игл, а также в случаях, когда больные гемофилией нуждаются в лечении, которое предусматривает внутривенное введение препаратов (например, противоопухолевая химиотерапия) и не предусматривает введение факторов свертывания. Необходимо определить потребность больных гемофилией в Российской Федерации в УДЦВД и разработать национальные рекомендации по их применению, учитывающие специфику медицинской помощи в регионах (удаленность от медицинских центров, обеспечение иглами, факторами свертывания, навыки медицинского персонала и т. д.).

#### Информация об авторах

Галстян Геннадий Мартинович (Galstyan G. M.), д. м. н., заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; телефон 8(495)-612-48-59, gengalst@gmail.com

Спирин Михаил Васильевич (Spirin M. V.), врач отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; телефон 8 (495) 612-48-59, spirin.m@blood.ru

Зозуля Надежда Ивановна (Zozulya N. I.), д. м. н., заведующая консультативным отделом коагулопатий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; телефон 8 (495) 612-29-12, zozulya.n@blood.ru

Полянская Татьяна Юрьевна (Polyanskaya T. Yu.), к. м. н., врач травматолог-ортопед высшей категории, старший научный сотрудник отдела гемофилии и других коагулопатий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; телефон 8 (495) 612-43-92, polyanskaya.t@blood.ru

Зоренко Владимир Юрьевич (Zorenko V. Yu.), д. м. н. заведующий отделом гемофилии и других коагулопатий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; телефон 8 (495) 613-24-69, zorenko.v@blood.ru

#### Литература

1. Ягудина Р. И., Молчанова Н. Б. Обзор рынка лекарственных препаратов, применяемых при лечении гемофилии в рамках федеральной программы «7 нозологий». Фармакоэкономика: теория и практика 2016; 4:109—114.
2. Румянцев А. Г., Румянцев С. А., Чернов В. М. Гемофилия в практике врачей различных специальностей. — М.: Гэотар-Медиа, 2013.
3. Зозуля Н. И., Андреева Т. А., Вдовин В. В., Перина Ф. Г. Регистр пациентов с ингибиторной формой гемофилии в Российской Федерации. Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины 2015; 1:186—188.

Остальные источники см. в References.

## References

1. Yagudina R. I., Molchanova N. B. Market review of medicines used in the treatment of hemophilia under the federal program "7 nosologies". *Pharmacoeconomics: theory and practice (Farmakoeconomika: teoria i praktika)* 2016; 4:109–114 (in Russian).
2. Rumyantsev A. G., Rumyantsev S. A., Chernov V. M. Hemophilia in practice of doctors of various specialties (*Gemofilia v praktike vrachei razlichnyh spetsialnostej*). — M.: GEOTAR-Media, 2013 (in Russian).
3. Zozulya N. I., Andreeva T. A., Vdovin V. V., Perina F. G. The register of inhibitor hemophilia patients in Russian Federation. *Actual questions of transfusiology and clinical medicine (Aktualnye voprosy transfuziologii i klinicheskoi meditsiny)* 2015; 1:186–188 (in Russian).
4. Sharp R., Cummings M., Fielder A. et al. The catheter to vein ratio and rates of symptomatic venous thromboembolism in patients with a peripherally inserted central catheter (PICC): A prospective cohort study. *Int J Nurs Studies*; 2015; 52:677–685.
5. Scott W. Central venous catheters. An overview of Food and Drug Administration activities. *Surg Oncol Clin N Am* 1995; 4:377–393.
6. Pittiruti M., Hamilton H., Biffi R. et al. ESPEN Guidelines on parenteral nutrition: central venous catheters (access, care, diagnosis and therapy of complications). *Clinical Nutrition* 2009; 28:365–377.
7. Hamilton H., Bodenham A. R., ed. *Central Venous Catheters*. — Chichester: Wiley-Blackwell, 2009.
8. Sandrucci S., Mussa B. ed. *Peripherally inserted central venous catheters*. — Milan, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer-Verlag Italia, 2014.
9. Debourdeau P., Kassab Chahmi D., Le Gal G. et al. 2008 SOR guidelines for the prevention and treatment of thrombosis associated with central venous catheters in patients with cancer: Report from the working group. *Annals of Oncology* 2009; 20:1459–1471.
10. Zerati A. E., Wolosker N., de Luccia N. et al. Totally implantable venous catheters: history, implantation technique and complications. *J Vasc Bras* 2017; 16:128–139.
11. Fonseca A., Nagel K., Decker K. et al. Central venous access device insertion and perioperative management of patients with severe hemophilia A: a local experience. *Blood coagulation & fibrinolysis* 2016; 27:156–159.
12. Bertamino M., Riccardi F., Banov L. et al. Hemophilia care in the pediatric age. *Journal of Clinical Medicine* 2017; 6:54.
13. Thom K. E., Holzenbein T., Jones N. et al. Arteriovenous shunts as venous access in children with Hemophilia. *Hemophilia* 2018; 24:429–435.
14. Santagostino E., Gringeri A., Berardinelli L. et al. Long-term safety and feasibility of arteriovenous fistulae as vascular accesses in children with Hemophilia: a prospective study. *Br J Haematol* 2003; 123:502–506.
15. Mancuso M. E., Berardinelli L. Arteriovenous fistula as stable venous access in children with severe hemophilia. *Hemophilia* 2010; 16:25–28.
16. Mancuso M. E., Berardinelli L., Beretta C. et al. Improved treatment feasibility in children with hemophilia using arteriovenous fistulae: the results after seven years of follow-up. *Haematologica* 2009; 94:687–692.
17. McCarthy W. J., Valentino L. A., Bonilla A. S. et al. Arteriovenous fistula for long-term venous access for boys with hemophilia. *J Vasc Surg* 2007; 45:986–990.
18. Kulkarni R., Presley R. J., Lusher J. M. et al. Complications of Hemophilia in babies (first two years of life): a report from the Centers for Disease Control and Prevention Universal Data Collection System. *Hemophilia* 2017; 23:207–214.
19. Ewenstein B. M., Valentino L. A., Journeycake J. M. et al. Consensus recommendations for use of central venous access devices in hemophilia. *Hemophilia* 2004; 10:629–648.
20. Rodriguez V., Mancuso M. E., Warad D. et al. Central venous access device (CVAD) complications in hemophilia with inhibitors undergoing immune tolerance induction: Lessons from the international immune tolerance study. *Hemophilia* 2015; 21:e369–374.
21. Park Y. Availability of peripheral inserted central catheters in severe hemophilia patients with inhibitors. *Korean Journal of Pediatrics* 2008; 41:1360–1362.
22. Langley A. R., Stain A. M., Chan A. et al. Experience with central venous access devices (CVADs) in the Canadian hemophilia primary prophylaxis study (CHPS). *Hemophilia* 2015; 21:469–476.
23. Valentino L., Ewenstein B., Navickis R. J. et al. Central venous access devices in Hemophilia. *Hemophilia* 2004; 10:134–146.
24. Mancuso M. E., Mannucci P. M., Sartori A. et al. Feasibility of prophylaxis and immune tolerance induction regimens in haemophilic children using fully implantable central venous catheters. *Br J Haematol* 2008; 141:689–695.
25. Valentino L. A., Kawji M., Grygotis M. Venous access in the management of hemophilia. *Blood Reviews*; 2011; 25:11–15.
26. Buckley B., Dreyfus J., Prasad M. et al. Burden of illness and costs among paediatric hemophilia patients with and without central venous access devices treated in US hospitals. *Hemophilia* 2018; 24:e93–102.
27. Santagostino E., Mancuso M. E. Venous access in haemophilic children: Choice and management. *Hemophilia* 2010; 16:20–24.
28. Valentino L. A., Kapoor M. Central venous access devices in patients with hemophilia. *Expert Review of Medical Devices* 2005; 2:699–711.
29. Izzi G., Franchini M., Bonetti L. et al. The use of central venous catheters in Hemophilia patients. *Hemophilia* 2010; 16:29–31.
30. Miller K., Buchanan G. R., Zappa S. et al. Implantable venous access devices in children with hemophilia: a report of low infection rates. *J Pediatr* 1998; 132:934–948.
31. Damiano M. L., Hutter J. J., Group T tri-regional nursing. Immune tolerance for Hemophilia patients with inhibitors: analysis of the western United States experience. *Hemophilia* 2000; 6:526–532.
32. Morado M., Jimenez-Yuste V., Villar A. et al. Complications of central venous catheters in patients with hemophilia and inhibitors. *Hemophilia* 2001; 7:551–556.
33. Bollard C. M., Teague L., Berry E. W. et al. The use of central venous catheters (portacaths) in children with hemophilia. *Hemophilia* 2000; 6:66–70.
34. Guiffant G., Durussel J. J., Flaud P. et al. Flushing ports of totally implantable venous access devices, and impact of the Huber point needle bevel orientation: Experimental tests and numerical computation. *Medical Devices: Evidence and Research* 2012; 5:31–37.
35. Goossens G. A. Flushing and locking of venous catheters: available evidence and evidence deficit. *Nurs Res Pract* 2015; 2015:985686.
36. Khair K., Ranta S., Thomas A. et al. The impact of clinical practice on the outcome of central venous access devices in children with hemophilia. *Hemophilia* 2017; 23:e276–281.
37. Price V. E., Carcao M., Connolly B. et al. A prospective, longitudinal study of central venous catheter-related deep venous thrombosis in boys with hemophilia. *J Thromb Haemost* 2004; 2:737–742.
38. Journeycake J. M., Quinn C. T., Miller K. L. et al. Catheter-related deep venous thrombosis in children with hemophilia. *Blood* 2001; 98:1727–1731.

39. Ng F., Mastoroudes H., Paul E. et al. A comparison of Hickman line- and Port-a-Cath-associated complications in patients with solid tumours undergoing chemotherapy. *Clin Oncol* 2007; 19:551–556.
40. Verso M., Agnelli G. Venous thromboembolism associated with long-term use of central venous catheters in cancer patients. *J Clin Oncol* 2003; 21:3665–3675.
41. Dargaud Y., Meunier S., Negrier C. Hemophilia and thrombophilia: an unexpected association! *Hemophilia* 2004; 10:319–326.
42. Negrier C., Vial J., Vinciguerra C. et al. Combined factor IX and protein C deficiency in a child: Thrombogenic effects of two factor IX concentrates. *Am J Hematol* 1995; 48:120–124.
43. Girolami A., Scandellari R., Zanon E. et al. Non-catheter associated venous thrombosis in hemophilia A and B. A critical review of all reported cases. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 21:279–284.
44. Vepsäläinen K., Lassila R., Arola M. et al. Complications associated with central venous access device in children with hemophilia: A nationwide multicentre study in Finland. *Hemophilia* 2015; 21:747–753.
45. Sakai T., Kohda K., Konuma Y. et al. A role for peripherally inserted central venous catheters in the prevention of catheter-related blood stream infections in patients with hematological malignancies. *Int J Hematol* 2014; 100:592–598.
46. Dougherty L., Lister S., ed. *The Royal Marsden manual of clinical nursing procedures*. 9<sup>th</sup> edition. — Wiley-Blackwell, 2015.
47. Luft D., Schmoor C., Wilson C. et al. Central venous catheter-associated bloodstream infection and colonisation of insertion site and catheter tip. What are the rates and risk factors in haematology patients? *Ann Hematol* 2010; 89:1265–1275.

# ГЕМОГЛОБИНОПАТИИ СРЕДИ ВЗРОСЛЫХ ЖИТЕЛЕЙ САУДОВСКОЙ АРАВИИ В ГОРОДЕ ТАИФ

## Hemoglobinopathies among Saudi adults at Taif city, Saudi Arabia

Дахлави Х. А.<sup>1</sup>, Заини Р. Г.<sup>1</sup>, Замзами О. М.<sup>2</sup>, Альхумяни А. Ф.<sup>2</sup>

Dahlawi H. A.<sup>1</sup>, Zaini R. G.<sup>1</sup>, Zamzami O. M.<sup>2</sup>, Alhunyani A. F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Колледж прикладных медицинских наук, клинично-лабораторное отделение, Университет г. Таиф, Таиф, Саудовская Аравия  
<sup>2</sup> Генеральный директорат санитарии и гигиены Министерства здравоохранения, Таиф, Саудовская Аравия

<sup>1</sup> College of Applied Medical Sciences, Clinical laboratory department, Taif University, Taif, Saudi Arabia  
<sup>2</sup> General Directorate of Health Affairs, Ministry of Health, Taif, Saudi Arabia

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** Варианты гемоглобина могут проявляться либо гемоглобинопатиями, которые приводят к заболеваниям, либо оставаться непатологическими вариантами, которые не имеют клинических проявлений. Носители структурных вариантов гемоглобина имеют от 30 до 50% эритроцитов с вариантным гемоглобином. Наиболее распространенный вариант гемоглобина — гемоглобин S, который выявляется у 40% носителей и отвечает за более чем 80% нарушений, обусловленных гемоглобинопатиями. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно появляется 948 000 новых пар носителей вариантов гемоглобина и более чем 1,7 млн беременностей приходится на такие пары. Таким образом, очень важно обеспечить систематическую программу скрининга, особенно среди пар с высоким риском носительства вариантов гемоглобина. Это могло бы помочь предотвратить или/и уменьшить заболеваемость, обусловленную различными вариантами гемоглобина.

**Материалы и методы.** В настоящем исследовании изучены 9008 образцов крови мужчин и женщин из Саудовской Аравии, обратившихся в Центр добрачного скрининга (г. Таиф) с января по октябрь 2015 г. Образцы анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе BIO-RAD VARIANT II Haemoglobin Testing System, используя короткую программу бета-талассемии.

**Результаты.** В 118 случаях выявлены аномальные варианты гемоглобина. Наиболее часто, у 58,5% обследованных (69 случаев), встречалась гетерозиготность по гемоглобину S. Малая бета-талассемия выявлялась чаще среди женщин (в 64% случаев), чем среди мужчин (36% случаев).

### ABSTRACT

**Introduction.** Hemoglobin variants can be either hemoglobinopathies which are responsible for diseases or non-pathological variants which couldn't make any detectable disorder. Carriers with structural variant haemoglobin have 30 to 50% of the variant haemoglobin in their red blood cells. The most common variant hemoglobin is hemoglobin S, which accounts for 40% of carriers and responsible for more than 80% of disorders related to hemoglobinopathies. According to the World Health Organization (WHO) there are at least 948 000 new carrier couples, and over 1.7 million pregnancies to carrier couples every year. Thus, it is very important to provide a systematic carrier screening program specially among at-high risk couples. This might help to prevent or/and reduce the incidence of blood disorders that related to variant haemoglobin. The aim of this study was to assess the variant haemoglobin among Saudis who were attending the Centre of premarital screening.

**Materials and methods.** A total of 9008 blood samples were studied among Saudi male and female who were attending the Centre of premarital screening from January 2015 to October 2015 at Taif City. Samples were then analyzed by High Performance Liquid Chromatography.

**Results.** Abnormal haemoglobin fractions on HPLC were displayed in 118 cases. The result of this study showed that Hb S heterozygous was presented as the major abnormality with 58.5% followed by beta thalassemia minor with 21%.

**Conclusion.** Clear understanding the genetics and the prevalence of these diseases will provide opportunities for prevention or/and reduce the incidence. Thus, this study suggests that in addition to the huge efforts already accomplished by the Saudi Ministry of Health to prevent at-risk

**Вывод.** Ясное понимание генетики и распространенности этих заболеваний обеспечит возможности для их профилактики и/или снижения частоты. Данное исследование свидетельствует, что, в дополнение к огромным усилиям Министерства здравоохранения Саудовской Аравии, направленным на предупреждение браков, в которых высок риск получить больное потомство, ранняя диагностика нарушений гемоглобина может быть предложена молодым людям, чтобы они могли обсудить этот вопрос перед принятием решения о вступлении в брак.

**Ключевые слова:** бета-талассемия, генетические варианты, гемоглобинопатии, гемоглобин S, гетерозиготы, серповидноклеточная анемия

**Для цитирования:** Дахлави Х. А., Заини Р. Г., Замзами О. М., Альхумьяни А. Ф. Гемоглобинопатии среди взрослых жителей Саудовской Аравии в городе Таиф. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):159–165

doi: 10.25837/HAT.2018.44..2..006

**Для корреспонденции:** Хайсам Ахмад Дахлави  
Электронная почта: haythmdahlawi@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.08.2018

Принята к печати 15.10.2018

marriages, the early diagnosis for these disorders might be offered for young adults as they can discuss the issue in the early stage of the marriage proposal.

**Keywords:** beta thalassemia minor, genetic variations, hemoglobinopathies, Hb S heterozygous, sickle cell anemia

**For citation:** Dahlawi H. A., Zaini R. G., Zamzami O. M., Alhumyani A. F. Hemoglobinopathies among Saudi adults at Taif city, Saudi Arabia.

Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):159–165 (in Russian).

doi: 10.25837/HAT.2018.44..2..006

**For correspondence:** Haytham Ahmad Dahlawi

E-mail: haythmdahlawi@gmail.com

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 30 Aug 2018

Accepted 15 Oct 2018

## Введение

Молекула гемоглобина состоит из четырех глобиновых цепей. Фетальный гемоглобин (HbF) состоит из двух альфа- и двух гамма-цепей ( $\alpha_2\gamma_2$ ), в то время как нормальный гемоглобин взрослого человека (HbA) состоит из двух альфа- и двух бета-цепей ( $\alpha_2\beta_2$ ). В геноме человека есть две группы глобиновых генов, кодирующих  $\alpha$ -подобные и  $\beta$ -подобные цепи гемоглобинов. Генетические вариации этих генов могут привести к нарушениям в аминокислотной последовательности глобиновой цепи, что является основной причиной возникновения мутантных форм гемоглобина. Такие генетические изменения могут приводить к структурным изменениям аминокислотной последовательности и аномальным формам гемоглобина или уменьшать выработку глобиновых цепей [1, 2]. Некоторые из вариантов гемоглобина рассматриваются как гемоглобинопатии и ответственны за развитие таких заболеваний, как серповидноклеточная анемия и бета-талассемия. Кроме того, у лиц с унаследованной комбинацией гемоглобинов S, C, E, гемоглобином D-Пенджаб, бета-талассемией или  $\alpha_0$ -талассемией возможны серьезные нарушения гемоглобина [3]. С другой стороны, некоторые варианты гемоглобина рассматриваются как непато-

## Introduction

Hemoglobin consists of four globin chains: fetal hemoglobin (HbF) has two  $\alpha$  and two gamma chains ( $\alpha_2\gamma_2$ ) while the adult hemoglobin (HbA) has two  $\alpha$  and two  $\beta$  chains ( $\alpha_2\beta_2$ ). Genes in the  $\alpha$ -globin and  $\beta$ -globin gene are responsible to control globin-chain production. Genetic variations in these genes, which might lead to alterations in the amino acid substitution in a globin chain, are the main reason behind the mutant form of the hemoglobin variants. Such genetic changes can generate structural variants that affect the amino acid sequence and either produce abnormal haemoglobin or reduce the production of globin chains [1, 2]. Some of the hemoglobin variants are considered hemoglobinopathies and responsible for diseases occurrence such as sickle cell anemia (SCA) and beta thalassemia. In addition, individuals who inherit combinations of hemoglobin S, C, E, D Punjab,  $\beta$  thalassemia, or  $\alpha$  zero ( $\alpha_0$ ) thalassemia may have a serious hemoglobin disorder [3]. On the other hand, some hemoglobin variants considered non-pathological variants and couldn't make any detectable disorder, which means that they are harmless and without signs or symptoms.

Carriers (person has one normal beta gene and one abnormal beta gene) of structural variant haemoglobin

логические, могут не приводить к заболеваниям и не сопровождаются клиническими проявлениями.

У носителей структурных вариантов гемоглобина (лица, имеющие один нормальный бета-ген гемоглобина и один аномальный) от 30 до 50% эритроцитов несут аномальный гемоглобин. Например, у носителей талассемии выявляются малые эритроциты и в некоторых случаях — умеренная анемия, и более чем в 3,5% случаев выявляют HbA2 $\beta$ . В 2008 г. Всемирная организация здравоохранения показала, что 75% родившихся в 229 странах имели нарушения гемоглобина. Более того, значимые вариации гемоглобина выявляются по меньшей мере у 5,2% населения в мире и более чем у 7% беременных женщин [4].

Наиболее распространенный вариант гемоглобина — это гемоглобин S, который выявляется у 40% носителей и отвечает за более чем 80% нарушений, поскольку очень широко распространен. Сообщается, что более чем 70% детей с этим вариантом гемоглобина рождается в Африке. Ежегодно сообщается по меньшей мере о 948 000 новых пар носителей вариантов гемоглобина, вступающих в брак, и более чем о 1,7 млн беременных женщин из пары носителей вариантов гемоглобина. Modell et al. [5] сообщили о 19 странах, где нарушения гемоглобина наблюдались первично как результат миграции. Они получили эти данные, сопоставив информацию об этнической принадлежности или стране рождения жителей с частотой гена в странах — источниках миграции [5]. Смертность от гемоглобинопатий среди детей младше 5 лет в мире составляет 3,4%, а в Африке — 6,4%.

Раннее выявление и точная диагностика варианта гемоглобина могут играть роль в предупреждении у потомства таких серьезных заболеваний, как талассемия. Таким образом, должен проводиться скрининг систематических носителей гемоглобинопатий при первичном медицинском обследовании в странах, где распространена эта патология, прежде всего среди этнических меньшинств [6]. Программа пренатального скрининга уже имеется в некоторых азиатских странах, в странах Карибского бассейна и Южной Европы (за исключением Албании). Более того, в Великобритании диагностика гемоглобинопатий рекомендуется и предлагается в рамках первичной медицинской помощи парам, относящимся к группам риска [6].

Саудовская Аравия — одна из нескольких стран, в которых были предприняты эффективные шаги, направленные на предупреждение заболеваний, вызываемых нарушениями гемоглобина. В 2003 г. правительство Саудовской Аравии решило внедрить программу обследования перед вступлением в брак, чтобы уменьшить частоту гемоглобинопатий в Саудовской Аравии, включая серповидноклеточную анемию. В последние годы скрининг стал обязательным для всех пар, планирующих вступить в брак и запрашивающих разрешение на него [7]. Программа была дополнена гене-

have 30—50% of the variant haemoglobin in their red blood cells (RBCs). For example, thalassemia carriers have small RBCs and in some cases mild anemia and more than 3.5% of HbA2 $\beta$  are detected in thalassemia carriers. In 2008, World Health Organization (WHO) showed that 75% of births were having haemoglobin disorders in 229 countries. Moreover, among the world population at least 5.2% (and over 7% of pregnant women) carry a significant variant [5].

The most common variant haemoglobin is haemoglobin S, which accounts for 40% of carriers and is responsible for more than 80% of disorders because of the very high prevalence of carrier: accounting over 70% of all affected births occur in Africa. It has been estimated that there are at least 948 000 new carrier couples, and more than 1.7 million pregnancies to carrier couples every year. Modell and colleagues reported 19 countries where haemoglobin disorders occur primarily as a result of migration. Statistics were obtained by combining data on residents' ethnicity or country of birth with gene frequencies in countries of origin [5]. The mortality rate from haemoglobin disorders in children younger than five years was 3.4% and 6.4% worldwide and in Africa respectively.

Early detection as well as accurate diagnosis of variant haemoglobin play an important role in preventing the occurrence of different serious disorders like thalassemia major in offspring. Thus, systematic carrier screening must be provided among many countries through primary health care, where the disorders affect primarily ethnic minorities [6]. The prenatal screening program has been established in parts of Asia, parts of the Caribbean and most of southern Europe (except Albania). Moreover, in the United Kingdom this diagnosis is recommended and provided through primary health care for at-risk couples [6].

Saudi Arabia was one of the several countries, which adopted effective steps directed toward prevention. In 2003, the government of Saudi Arabia decided to implement a premarital screening program to decrease the incidence of the common hemoglobinopathies in Saudi Arabia, including sickle cell disease. In the next year, the screening test was made mandatory for all couples planning to marry and applying for a marriage license [7]. The program was complemented by genetic counseling services for the carriers and the diseased and offered by trained counselors and wedding authorities. These services were effective in improving awareness and provide equitable access to health services, improve quality of life of those affected and help to achieve primary, secondary and tertiary prevention [8].

The aim of this study was to assess the variant haemoglobin among Saudis who were attending the Centre of premarital screening in Taif city. This will help in prevention and management of various hemoglobinopathies.

тическим консультированием носителей мутаций и больных, которое проводят обученные консультанты и брачные службы. Эти меры позволили повысить осведомленность и обеспечить равный доступ к медицинскому обслуживанию, улучшили качество жизни больных гемоглинопатиями и помогли в области первичной, вторичной и третичной профилактики [8].

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы оценить распространенность различных вариантов гемоглобина среди жителей Саудовской Аравии, посетивших Центр добрачного скрининга в городе Таиф. Данные этого исследования помогут при профилактике и лечении различных гемоглинопатий.

## Материалы и методы

Данное поперечное исследование проводилось с января по октябрь 2015 г. В нем приняли участие в общей сложности 9008 здоровых мужчин и женщин из Саудовской Аравии в возрасте от 19 до 40 лет, обратившихся в Центр добрачного скрининга. У участников брали венозную кровь в объеме 2–3 мл, которую собирали в пробирки, содержащие ЭДТА-К<sub>2</sub> (Guanazhou, Improne, Medical Instruments, Co. LTD.), и тщательно перемешивали. На автоматическом клеточном анализаторе (Symex-CellDyne) выполняли общий анализ крови. После этого образцы анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе BIO-RAD VARIANT II Haemoglobin Testing System, используя короткую программу для бета-талассемии. Подготовка образцов крови не требовалась, если только объем образца не составлял менее 500 мкл (в этом случае образец предварительно разбавляли вручную). Пробирки с образцами загружали в штатив для образцов на приборе. Для каждой серии исследования цельной крови использовали картридж.

Для каждой серии применяли калибратор гемоглобина A2/F и два уровня контроля — уровень 1 и уровень 2 (BIO-RAD Laboratories). Уровень 1 содержал гемоглобины A2 и F (норма), а уровень 2 содержал гемоглобины A2, F и S (патологический контроль). Общая приемлемая площадь составляла от 1 до 3 млн мкВ/с. Для каждого анализа выполнялась редукция исходных данных с помощью программного обеспечения «Variant II Clinical Data Management (CDM) Software» (BIO-RAD Laboratories). Для упрощения интерпретации результатов для каждого образца/хроматограммы с помощью программы Clinical Data Management (CDM) генерировалось сообщение, показывающее все фракции элюированного гемоглобина. Для нормальной фракции или обычных вариантов гемоглобина принимали интегрированный пик на хроматограмме в определенном производителем окне времени сохранения (табл. 1).

*Этические соображения.* Всем участникам была разъяснена цель исследования, и все они подписали информированное согласие на участие в исследовании. Это

## Material and Methods

This study is a cross-sectional study performed from January 2015 to October 2015. A total of 9008 healthy Saudi male and female attending the Centre of premarital screening and aged between 19 to 40 years old were participating in this study. Venous blood (2–3 ml) was collected in EDTA-K<sub>2</sub> tube (Guanazhou, Improne, Medical Instruments, Co. LTD.) and mixed well. Samples were analyzed in automated cell counter (Symex-CellDyne) for complete blood counts (CBC). Samples were then analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) on the BIO-RAD VARIANT II Haemoglobin testing system using the VARIANT II  $\beta$ -thalassemia short program. No sample preparation was required unless sample was less than 500  $\mu$ l. In such case, sample was manually pre-diluted. The sample tubes were loaded into sample racks and placed on the sampling station. A whole Blood Primer was used at the beginning of each run to condition the cartridge for analysis.

Haemoglobin A2/F calibrator and two levels (Level 1 and 2) of controls (BIO-RAD Laboratories) were used at the beginning of each run. The haemoglobin control level 1 containing A2 and F (normal) and level 2 containing A2, F and S (abnormal). The total area acceptable was between one to three million  $\mu$ Volt/second. The Variant II Clinical Data Management (CDM) Software (BIO-RAD Laboratories) performs reduction of raw data collected from each analysis. To aid the interpretation of results. For each sample a chromatogram/ sample report is generated by CDM showing all haemoglobin fractions eluted. The integrated peaks are assigned to manufacturer-defined windows derived from specific retention time (RT) of normal haemoglobin fractions and common variants (Table 1).

*Ethical Considerations.* The study purpose was explained to all participants, then, an informed consent was taken from them. This study was approved by the research ethical committee of the health affairs and committee of college of applied medical sciences, at Taif University.

*Statistical Analysis.* Data was analyzed by SPSS version 19. Frequencies and percentages were calculated.

**Таблица 1.** Приятые производителем окна для BIO-RAD Variant II HPLC System

Окно	Время сохранения (мин)
P <sub>1</sub>	0,63–0,85
F	0,98–1,20
P <sub>2</sub>	1,24–1,40
P <sub>3</sub>	1,40–1,90
A <sub>0</sub>	1,90–3,10
A <sub>2</sub>	3,30–3,90
D	3,90–4,30
S	4,30–4,70
C	4,90–5,30

исследование было одобрено Исследовательским этическим комитетом по вопросам здоровья и комитетом колледжа прикладных медицинских наук университета города Таиф.

*Статистический анализ.* Данные анализировались с помощью программы SPSS, версия 19. Рассчитывали частоты и проценты.

## Результаты

Всего было исследовано 9008 образцов крови. Среди них в 118 случаях (1,3%) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии были выявлены аномальные фракции гемоглобина. Результаты исследования показали, что наиболее часто, в 69 случаях (58,5%), встречались лица, гетерозиготные по гемоглобину S. Малая бета-талассемия выявлялась чаще среди женщин (64% случаев), чем среди мужчин (36% случаев). Гетерозиготное носительство гемоглобина D было распространено только среди мужчин.

**Таблица 2.** Количество и частота вариантов гемоглобина среди мужчин и женщин в Саудовской Аравии

Вариант гемоглобина	Число (%)	Мужчины	Женщины
Малая бета-талассемия	25 (21,2%)	9	16
Гемоглобин D	4 (3,4%)	4	0
Гемоглобин E	3 (2,5%)	1	2
Серповидноклеточная аномалия эритроцитов	69 (58,5%)	32	37
Серповидноклеточная анемия	3 (2,5%)	1	2
Персистенция фетального гемоглобина	14 (12%)	4	10
Всего	118	51	67

**Table 1.** Manufacturer assigned windows for BIO-RAD Variant II HPLC System

Window	Retention time (min)
P <sub>1</sub>	0.63–0.85
F	0.98–1.20
P <sub>2</sub>	1.24–1.40
P <sub>3</sub>	1.40–1.90
A <sub>0</sub>	1.90–3.10
A <sub>2</sub>	3.30–3.90
D	3.90–4.30
S	4.30–4.70
C	4.90–5.30

## Results

A total of 9008 blood samples were studied. Of these, 118 (1.3%) cases displayed abnormal haemoglobin fractions on HPLC. The result of this study showed that Hb S heterozygous was presented as the major abnormality with 58.5% (69 cases). Beta thalassemia minor was detected at higher range among female when compared to male with 64% and 36% respectively. However, the prevalence of haemoglobin D heterozygous was only detected among male participants. The result of this study also showed that the hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH) was detected among 14 cases (12%) with female predominance.

**Table 2.** Number and percentage of HB variants among Saudi male and female participants

HB variants	Number	Male	Female
Beta thalassemia minor	25 (21.2%)	9	16
Hb D	4 (3.4%)	4	0
Hb E	3 (2.5%)	1	2
Sickle cell trait	69 (58.5)	32	37
Sicke cell anemia	3 (2.5%)	1	2
HPFD	14 (12%)	4	10
Total	118	51	67

Результаты нашего исследования показали также, что наследственная персистенция фетального гемоглобина была выявлена у 14 обследованных (12%), преимущественно среди женщин. В трех случаях у взрослых была выявлена гомозиготность по гемоглобину S, что указывало на наличие у них серповидноклеточной анемии. Также были выявлены три человека с носительством гемоглобина E (2,5%). Число случаев и частота выявления нарушений гемоглобина представлены в табл. 2.

## Обсуждение

Это первое исследование в городе Таиф, находящемся на западе Саудовской Аравии, направленное на изучение носительства различных вариантов гемоглобина среди мужчин и женщин Саудовской Аравии, обратившихся в Центр добрачного скрининга города Таиф в течение 6 месяцев, с января по октябрь 2015 г. Из-за высокой смертности больных гемоглинопатиями и связанных с этими заболеваниями финансовых, социальных и психологических издержек раннее обнаружение и точный диагноз варианта гемоглинопатии играют важную роль в профилактике у потомства таких серьезных заболеваний, как серповидноклеточная анемия [9].

В 2011 г. в северном пограничном районе Саудовской Аравии было проведено исследование, в котором было найдено, что распространенность гемоглинопатий составляет 2,8%, при этом большинство обследованных были носителями бета-талассемии [10]. Однако результаты исследования показали, что ведущей аномалией была гетерозиготность по гемоглобину S, за которой следовала малая бета-талассемия. Другое исследование проводилось с февраля 2004 г. по январь 2005 г. У лиц, которые обратились за разрешением на вступление в брак в 70 лабораторий Министерства здравоохранения Саудовской Аравии, в 4,2% случаев были обнаружены серповидноклеточные аномалии эритроцитов, у 3,22% — маркеры талассемии, у 0,26% — серповидноклеточная анемия и у 0,07% — талассемия [7]. Кроме того, в этом же исследовании установлено, что серповидноклеточная аномалия эритроцитов наиболее часто выявлялась в восточных регионах Саудовской Аравии, в районе города Эль-Кунфуда (15,85% случаев), в то время как заболеваемость талассемией была наиболее высокой в городе Джизан (0,39% случаев) и на севере страны (0,27%).

В данном исследовании четко показана низкая распространенность гетерозиготного носительства гемоглобина E по сравнению с гетерозиготным носительством гемоглобина S и малой бета-талассемией среди мужчин и женщин Саудовской Аравии. Эти результаты согласуются с данными, полученными Al-Jaouni [11], согласно которым распространенность гемоглобина E была наименьшей по сравнению с распространенностью других нарушений гемоглобина.

Three cases of adults were diagnosed with Hb S homozygous, which indicated the presence of sickle cell anaemia. Similarly, only three cases reported with HbE (2.5%). The number and percentage of haemoglobin abnormalities were summarized in table 2.

## Discussion

This is the first study to be done in the Taif city in the western region of the Kingdom of Saudi Arabia to detect various Hb variants among Saudi male and female who were attending the pre-marriage clinic at Taif city during six months from January 2015 to October 2015. Since the high mortality rate and the financial, social, and psychological cost related to patients with hemoglobinopathies, thus early detection as well as accurate diagnosis of variant haemoglobin plays an important role in preventing the occurrence of such serious disorders including sickle cell disease in offspring [9].

In 2011, a study was performed at north border region of Saudi Arabia and found that the prevalence of hemoglobinopathies was 2.8% and the majority of the participants were diagnosed as beta thalassemia carriers [10]. However, the result of this study showed that the Hb S heterozygous was presented as the major abnormality followed by beta thalassemia minor. Another study has performed during February 2004 to January 2005 among all the individuals who applied for a marriage license at 70 laboratories of Ministry of health all over Saudi Arabia and found that 4.20% had sickle cell trait, 3.22% had thalassemia trait, 0.26% had sickle cell disease, and 0.07% had thalassemia disease [7]. Moreover, within the same study they found that thalassemia trait was highest in the eastern region followed by Qunfudah (15.85%) while thalassemia disease was highest in Jazan (0.39%), followed by the northern region (0.27%).

This study showed clearly the low prevalence of Hb E compared to HbS heterozygous and beta thalassemia minor disorders among Saudi's male and female. This result is in agreement with the finding of Al-Jaouni [11], which showed that the prevalence of haemoglobin E trait was the least frequent compared to the other investigated hemoglobin disorders.

Memish and Saeedi, have reported that there was highest detection of at-risk marriage and also greater increase in marriage cancellation among at-risk couples in eastern region compared to other regions of Saudi Arabia between 2004 and 2009 [12]. Clear understanding for the genetics and the prevalence of these diseases will provide opportunities for prevention or /and reduce the incidence. Thus, this study suggests that in addition to the huge efforts

Memish и Saeedi [12] сообщили о высокой частоте выявления «рискованных» браков и отмены браков среди подверженных риску пар на востоке страны по сравнению с другими областями Саудовской Аравии. Ясное понимание генетики и распространенности этих заболеваний обеспечит возможности для их профилактики и/или снижения частоты. Таким образом, это исследование свидетельствует о том, что, в дополнение к огромным усилиям, уже приложенным Министерством здравоохранения Саудовской Аравии для предупреждения «рискованных» браков с помощью программы добрачного скрининга, ранняя диагностика нарушений гемоглобина может быть предложена молодым людям в выпускных классах школы и среди групп высокого риска. В дальнейшем они могут обсудить этот вопрос перед принятием решения о вступлении в брак.

## Литература

### References

1. Trent R. J. Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clinical Biochemist Reviews* 2006; 27:27–38.
2. Urbinati F., Madigan C., Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies; Part II: thalassaemias. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2006; 8:1–26.
3. Angastiniotis M., Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 850:251–269.
4. Weatherall D., Clegg J. Distribution and population genetics of the thalassaemias // In: *The Thalassaemia Syndromes*, fourth edition. — Wiley-Blackwell, 2001; pp. 237–284.
5. Modell B., Darlison M., Birgens H. et al. Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2007; 67:39–70.
6. Modell B., Harris R., Lane B. et al. Informed choice in genetic screening for thalassaemia during pregnancy: audit from a national confidential inquiry. *BMJ* 2000; 320:337–341.
7. AlHamdan N. A., AlMazrou Y. Y., AlSwaidi F. M. et al. Premarital screening for thalassemia and sickle cell disease in Saudi Arabia. *Genetics in Medicine* 2007; 9:372–377.
8. Zaini R. G. Sickle-cell anemia and consanguinity among the Saudi Arabian population. *Archives of Medicine* 2016; 8:3.
9. Sachdev R., Dam A. R., Tyagi G. Detection of Hb variants and hemoglobinopathies in Indian population using HPLC: report of 2600 cases. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2010; 53:57.
10. Alenazi S. A., Ali H. W., Alharbi M. G. et al. Prevalence of thalassemia and sickle cell disease in northern border region of Saudi Arabia. *Kashmir J Med Sci* 2015; 1:3–6.
11. Al-Jaouni S. K. Prevalence of thalassemia disorders and hemoglobinopathies in Jeddah, Western Saudi Arabia. *J Appl Hematol* 2010; 1:43–46.
12. Memish Z. A., Saeedi M. Y. Six-year outcome of the national premarital screening and genetic counseling program for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia in Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine* 2011; 31:229.

already accomplished by the Saudi Ministry of Health to prevent at-risk marriages through premarital screening program, the early diagnosis for these disorders might be offered for young individuals such as at the high school level and among at-high risk population. Subsequently, they can discuss the issue in the early stage of the marriage proposal.

# ЛАТЕНТНАЯ ФОРМА ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В

## Occult form of infection caused by the hepatitis B virus

Туполева Т. А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Tupoleva T. A.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

### РЕЗЮМЕ

В обзоре представлены данные литературы, отражающие характеристику, формирование, особенности течения, диагностики и профилактики латентной формы инфекции, вызванной вирусом гепатита В (ВГВ). Латентная форма вирусного гепатита В (ЛГВ) характеризуется низким уровнем репликации ВГВ, когда ДНК вируса выявляется в печени в низких концентрациях (менее 200 МЕ/мл) и может не обнаруживаться в сыворотке, но могут присутствовать антитела к ядерному белку (анти-НВс) и/или поверхностному (анти-НВs) белку ВГВ. В большинстве случаев ЛГВ вызвана вирусом, геномы которого репликативно компетентны и сопоставимы с генетической гетерогенностью изолятов вируса от лиц с HBsAg-положительным гепатитом В. В индукцию и поддержание латентной формы инфекции вовлечены факторы хозяина. Клиническое выздоровление при инфекции ВГВ отражает не полную эрадикацию вируса, а лишь способность иммунной системы держать под контролем репродукцию оставшихся в печени вирусов после клинического разрешения болезни. Многочисленные клинические исследования показывают, что любые условия, вызывающие иммуносупрессию, могут спровоцировать реактивацию ЛГВ с появлением типичного серологического профиля активной инфекции. Клиническое значение латентной инфекции ВГВ определяется тремя ключевыми моментами: 1) передача вируса в основном происходит при переливании крови и трансплантации печени с последующим развитием острого гепатита В у реципиента; 2) на фоне иммуносупрессии возможна реактивация ЛГВ; 3) латентная инфекция ВГВ способствует прогрессированию хронических заболеваний печени другой этиологии и играет определенную роль в гепатоканцерогенезе. Те-

### ABSTRACT

This paper reviews the literature on occult hepatitis B virus (HBV) infection (OBI), discussing its definition, pathogenesis, diagnosis and prevention. OBI is characterized by a low level of HBV replication, when the viral DNA is detected in the liver at low concentrations (< 200 IU/ml) and may be undetectable in serum, while antibodies to the HBV core protein (anti-HBc) and/or to its surface protein (anti-HBs) may be present. In most cases, OBI is caused by the virus whose genome is replicatively competent and comparable to the genomes isolated from individuals with HBsAg-positive infection. Host factors are strongly involved in the induction and maintenance of an occult form of infection. Clinical recovery from HBV infection does not imply complete eradication of the virus, but only the ability of the immune system to keep reproduction of the remaining virus in the liver under control. Numerous clinical studies have shown that any immunosuppressive factors may trigger HBV reactivation producing a typical serological profile of active infection. The clinical significance of OBI is summarized by the following three key points: 1) the "occult" virus can be transmitted, mainly with blood transfusions or liver transplantation, followed by development of acute hepatitis B in the recipient; 2) HBV can get reactivated during immunosuppression, and 3) latent HBV infection contributes to the progression of other chronic liver diseases and plays a role in hepatocarcinogenesis. Testing for anti-HBc is a simple precautionary measure to prevent transmission of HBV during blood transfusion, especially in immunocompromised patients.

This review is based on 60 publications, 3 Russian and 57 foreign, retrieved from by the following databases: PubMed, Google Scholar, Scopus, Springer, Cochrane Library, Wiley Online Library, and Russian Science Citation Index.

стирование на анти-НВс является простой мерой предосторожности для предотвращения передачи ВГВ при переливании крови, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом.

Использованы 60 источников литературы, из них 3 отечественных и 57 зарубежных, представленных в следующих информационных системах: PubMed, Google Scholar, Scopus, Springer, The Cochrane Library, Wiley Online Library, ПИНЦ.

**Ключевые слова:** вирус гепатита В; латентная форма инфекции; обзор

**Для цитирования:** Туполева Т. А. Латентная форма инфекции, вызванная вирусом гепатита В. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):166–173

doi: 10.25837/HAT.2018.68..2..007

**Для корреспонденции:** Туполева Татьяна Алексеевна, кандидат медицинских наук, заведующая отделом вирусологической диагностики, врач-вирусолог ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Российская Федерация

Электронная почта: ttupoleva@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.02.2018

Принята в печать 16.05.2018

**Keywords:** hepatitis B virus; occult form of infection; review

**For citation:** Tupoleva T. A. Occult form of infection caused by the hepatitis B virus. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):166–173 (in Russian) doi: 10.25837/HAT.2018.68..2..007

**For correspondence:** Tupoleva Tatiana A., MD, PhD, head of virology diagnostic department, physician virologist of National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation  
E-mail: ttupoleva@mail.ru

**Information about authors:**

Tupoleva T. A., <http://orcid.org/0000-0003-4668-9379>, ID: 6505936805.

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 13 Feb 2018

Accepted 16 May 2018

## Введение

Естественное течение хронического гепатита В схематично делится на пять фаз (необязательно последовательных): фаза иммунной толерантности; иммуноактивная НВеАg-позитивная фаза; неактивное носительство вируса гепатита В (ВГВ); НВеАg-негативная фаза; НВsАg-негативная фаза [1]. Последняя из них — латентная форма вирусного гепатита В (ЛГВ), при которой отсутствуют клинические проявления заболевания. Это фаза с низким уровнем репликации ВГВ, когда ДНК ВГВ выявляется в печени в низких концентрациях (менее 200 МЕ/мл) и может не обнаруживаться в сыворотке, однако могут присутствовать антитела к ядерному (анти-НВс) и/или поверхностному (анти-НВs) белку ВГВ [2].

Интерес к проблеме ЛГВ возник с момента открытия инфекционной природы «сывороточного» гепатита, но центральным вопросом гепатологии она стала в 1999 г., после опубликования результатов тестирования геномов ВГВ в биоптатах, полученных у большого числа НВsАg-негативных пациентов с хроническими заболеваниями печени. Это исследование показало, что ЛГВ может ускорять прогрессию цирроза печени у больных хроническим вирусным гепатитом С. Латентное течение вирусного гепатита В не связано с наличием мутаций ВГВ [3]. Существовало мнение [4], что селекции латентных форм вирусно-

го гепатита В способствуют как наличие мутаций в гене, кодирующем НВsАg, так и вакцинация против гепатита В. Однако ЛГВ обусловлена подавлением репликативной активности вируса, причем причины такого подавления выяснены не до конца, но в этот процесс вовлечена иммунная система. Иммуносупрессивные состояния приводят к реактивации заболевания и развитию острого гепатита [5]. ЛГВ может способствовать прогрессии фиброза, цирроза печени и развитию гепатоцеллюлярной карциномы, кроме того, при ней сохраняется значительная часть трансформирующих свойств ВГВ, например способность интегрироваться в геном хозяина и синтезировать про-онкогенные белки [6].

## Современная биология ВГВ и диагностическая методология

В ряде случаев, несмотря на наличие эпизодических геномов ВГВ на внутривнутрипеченочном уровне, НВsАg невозможно выявить с помощью коммерческих тестов — либо вследствие вариантов ВГВ с изменениями в гене S и нарушением синтеза S-белков (S-ускользающие мутанты), либо за счет мутаций ВГВ с повреждением репликативной активности [7]. В большинстве случаев ЛГВ вызвана вирусом, геномы которого репликативно компетентны и сопоставимы с генетической

гетерогенностью изолятов вируса, выделенных у лиц с HBsAg-позитивной инфекцией [8]. ЛГВ является результатом подавления репликации ВГВ и экспрессии его генома, которое обусловлено не мутациями, а другими механизмами. ЛГВ часто связана с наличием анти-НВс и анти-НВс, но у 20% лиц с латентным течением инфекции отсутствуют все маркеры ВГВ в сыворотке крови [9].

Можно выделить серопозитивный (анти-НВс и/или анти-НВс-положительный) и серонегативный (анти-НВс и анти-НВс-отрицательные) варианты ЛГВ. При наличии анти-НВс и анти-НВс HBsAg может перестать определяться либо после быстрого разрешения острого гепатита, либо после нескольких лет течения инфекции. Антитела к белкам ВГВ могут отсутствовать с начала инфекции, что было подтверждено в эксперименте на сурках [8].

В настоящее время нет доступных экспериментальных систем для адекватного изучения инфекции ВГВ — комплексного события, характеризующегося наличием различных и часто нестабильных фаз [10]. Исследование *in vitro*, где было показано, что изоляты ВГВ, выделенные из ткани печени больного ЛГВ, полностью восстанавливают репликацию, транскрипцию и синтез белков вируса в культуре клеток [8], доказывает, что именно факторы хозяина вовлечены в индукцию и поддержание латентных форм инфекции.

В клинических исследованиях показано, что любые условия, приводящие к иммуносупрессии (гематологические злокачественные новообразования, химиотерапия или иммунотерапия и другие), могут вызвать реактивацию ВГВ с появлением серологических маркеров активной инфекции [9, 11]. Кроме того, CD4- и CD8-клетки, т. е. клетки «длительной памяти» против антигенов ВГВ, обнаруживаются и через несколько лет после выздоровления от острого гепатита В. В латентной фазе инфекции вирус синтезирует незначительное количество антигенов, которые не обнаруживаются с помощью существующих лабораторных методов, но их достаточно для поддержания ВГВ-специфического Т-клеточного ответа [12, 13]. В печени инфицированных лиц обнаружены, помимо молекул ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ВГВ, все вирусные транскрипты [14, 15]. При помощи количественной ПЦР в режиме реального времени выявлены небольшие, но все же значимые количества мРНК вируса. Таким образом, клиническое выздоровление при инфекции ВГВ отражает не полную эрадикацию вируса, а лишь способность иммунной системы держать под контролем репродукцию оставшихся вирусов в печени после клинического разрешения болезни [6].

У больных ЛГВ может формироваться разный ВГВ-специфический Т-клеточный ответ в зависимости от наличия или отсутствия анти-НВс [16]. Т-клетки в сравнимых количествах обнаруживаются и при нали-

чии, и при отсутствии анти-НВс, но выработка этими клетками интерферона  $\gamma$  во втором случае значительно ниже. В эксперименте на сурках показано, что заражение в низкой дозе (менее  $10^3$  вирионов) приводит к хронической инфекции при отсутствии вирусных маркеров в сыворотке крови. У сурков с первично латентной формой инфекции ВГВ не формировался защитный иммунитет. Авторы предположили, что Т-клеточный ответ запускается только после инфицирования большими дозами вируса [17]. Исследование ВГВ-специфического иммунного ответа у доноров крови с ЛГВ подтвердило это наблюдение: Т-клеточный ответ у них был сильнее, чем у неактивных носителей и даже чем у пациентов с разрешившейся формой заболевания [18]. Эти данные привели авторов к выводу о том, что иммунная система хозяина может сильно подавлять репликацию ВГВ, обеспечивая очень низкую (в ряде случаев невыявляемую) вирусную нагрузку и отсутствие обнаруживаемого HBsAg [18].

Доказательства роли иммунной системы хозяина в управлении ЛГВ получены в исследованиях, проведенных у ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых наличие ВГВ в крови ассоциировалось с низким количеством CD4-клеток [19]. При наличии более 500 CD4-клеток на  $1 \text{ мм}^3$  латентного течения вирусного гепатита В не наблюдалось. Таким образом, дефицит клеточного иммунитета, обусловленный снижением количества CD4-клеток при ВИЧ-инфекции, может привести к потере контроля над ВГВ и активации репликации вируса до обнаруживаемых концентраций. Исследование экспрессии цитокинов у ВИЧ-инфицированных с ЛГВ выявило значительное снижение уровня сывороточного sFas, что указывает на ингибирование апоптоза, который, в свою очередь, ответственен за частичный клиренс вируса [20].

Не только адаптивный, но и врожденный иммунный ответ может играть роль в контроле вирусной репликации. Эксперименты на трансгенных мышках и шимпанзе показали, что воспалительные цитокины, такие как интерферон типа I и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , могут эффективно подавлять репликацию вируса через нецитотоксические иммуноопосредованные механизмы [21]. Клетки печени сами способны обеспечивать первичный иммунный ответ на инфекцию ВГВ путем продукции интерферонов типа I, которые подавляют репликацию вируса [22]. Следовательно, врожденный иммунный ответ также контролирует активность ВГВ, особенно при серонегативном варианте ЛГВ.

Кроме рассмотренных выше иммунологических факторов, существуют и эпигенетические факторы, влияющие на формирование ЛГВ. Молекулы ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ВГВ накапливаются в ядре инфицированных гепатоцитов в виде стабильной минихромосомы, упакованной в нуклеосомный массив гистонов и негистоновых белков, ана-

логично хроматину клеток хозяина [23]. Подобная нуклеосомная организация вирусного генома описана для нескольких ДНК-содержащих вирусов, таких как полиомавирусы, вирусы герпеса, обезьяний вирус 40 и вирусы папилломы человека и крупного рогатого скота [24]. Вирус Эпштейна—Барр и другие герпесвирусы, например, широко используют эпигенетические модификации гистонов в качестве механизма контроля транскрипции во время своего латентного статуса [25, 26].

Разработан чип на основе ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ВГВ [23, 27]. Используя данный чип, удалось обнаружить, что несколько клеточных факторов транскрипции, а также различные ферменты, модифицирующие хроматин, могут связывать ковалентно замкнутую кольцевую ДНК ВГВ в клетках, когда происходит репликация ВГВ [27]. Данные анализа биоптатов печени пациентов с ЛГВ показали, что глубокое подавление транскрипции/репликации вирусных эписом в печени происходит на уровне организации хроматина [6]. Интерферон  $\alpha$  способен ингибировать управляемую ковалентно замкнутой кольцевой ДНК транскрипцию геномных и субгеномных РНК. В дополнение к посттрансляционной модификации гистонов, метилирование регионов ДНК ВГВ, богатых сгруппированными последовательностями остатков цитозина с гуанином (СрG-островков), может также способствовать регулированию экспрессии генов вируса [23].

Мутации в ключевых иммунодоминантных регионах поверхностного белка способны уменьшить узнавание вируса иммунной системой, делеции в области *preS1* нарушают упаковку вируса, структурные изменения геномных регуляторных областей приводят к сильному уменьшению экспрессии HBsAg, мутации влияют также на посттрансляционную выработку белков ВГВ [2, 7, 28]. Однако в изолятах ВГВ, полученных от большинства лиц с ЛГВ, мутации не обнаружены; при этом, что важно, их находили и в изолятах от больных с активной инфекцией ВГВ, в том числе и с высокой вирусной нагрузкой [8, 18, 29].

## Лабораторная диагностика

В настоящее время нет стандартных валидированных методов обнаружения ЛГВ. Наиболее точным считается анализ ткани печени на наличие ДНК ВГВ с использованием высокочувствительных и специфичных методов, т. е. ПЦР, причем олигонуклеотидные праймеры должны быть специфичны для различных регионов вирусного генома при сохранности общих нуклеотидных последовательностей всех генотипов [2].

Однако образцы ткани печени редко доступны, поскольку биопсия печени в большинстве случаев не может быть выполнена в силу сложности метода и риска осложнений. Наиболее распространенным подходом к выявлению инфицированных ВГВ лиц является

анализ образцов сыворотки или плазмы крови. Чтобы повысить чувствительность теста, рекомендуется выделение ДНК из 1 мл сыворотки (или плазмы) и серийное тестирование собранных образцов с учетом пульсационного профиля виремии [2]. Ряд ученых считает, что для выявления лиц с ЛГВ следует использовать серологический анализ на анти-НВс, особенно при обследовании доноров крови, тканей или органов, когда реципиенту предполагается проведение иммуносупрессивной терапии [2, 30, 31].

Носители ЛГВ могут стать источником передачи ВГВ в случае переливания крови с последующим развитием классической клинической картины гепатита у реципиента [30—33]. Риск передачи ВГВ при переливании крови резко сократился в связи с повышением чувствительности и специфичности диагностических тестов и расширением спектра исследуемых инфекционных маркеров [34]. Посттрансфузионный гепатит В сегодня редкость в Европе и Америке, хотя некоторые случаи по-прежнему фиксируются [6]. Трансфузионная передача ВГВ возможна, если в условиях стандартного обследования доноров крови останутся не выявленными следующие лица: во-первых, находящиеся в начале острой фазы инфекции — «период окна» (HBsAg-отрицательные), — хотя количество таких доноров сокращается за счет вакцинации [32]; во-вторых, носители «дикого» типа вируса, репликация и экспрессия генов которого подавлены; в-третьих, те, кто инфицирован мутантными штаммами ВГВ, репликативно компетентными, но производящими аномальные поверхностные белки, которые не выявляются коммерчески доступными скрининговыми наборами реагентов.

Введение ПЦР-тестирования на ДНК ВГВ крови доноров показало, что этот маркер обнаруживается лишь у небольшой части HBsAg-негативных доноров. Хотя данные не являются однородными (среди первичных или повторных доноров крови или населения в целом), обнаружение ДНК вируса при отсутствии HBsAg зависит от распространенности инфекции в различных географических регионах. Кроме того, лица с ЛГВ и лица, инфицированные мутантными вариантами вируса, могут быть выявлены с помощью тестирования на анти-НВс (примерно 50% из них положительны также по анти-НВс). В редких случаях у невакцинированных доноров анти-НВс присутствуют без анти-НВс [35, 36]. Тестирование на анти-НВс является простой мерой предосторожности, позволяющей предотвратить передачу ВГВ при переливании крови, особенно у иммунокомпрометированных пациентов [37].

В ФГБУ «НМИЦ гематологии» после введения рутинного скрининга образцов крови доноров на анти-НВс регистрируются единичные случаи выявления ДНК ВГВ при тестировании серонегативных образцов [38]. Тестирование образцов крови на анти-НВс целесообразно для выявления доноров с ЛГВ и по-

вышает вирусную безопасность гемотрансфузий для больных заболеваниями системы крови, поскольку отсутствуют новые случаи доказанной трансфузионной передачи ВГВ [39].

## Клиническое значение латентной инфекции ВГВ

Клиническое значение латентной инфекции ВГВ определяется тремя ключевыми моментами: 1) передача вируса в основном происходит при переливании крови и трансплантации печени с последующим развитием острого гепатита В у реципиента; 2) возможна реактивация вирусного гепатита В на фоне иммуносупрессии; 3) латентная инфекция ВГВ, способствуя прогрессированию хронических заболеваний печени другой этиологии, играет определенную роль в гепатоканцерогенезе.

Латентная инфекция ВГВ характеризуется периодами переменной виремии, когда вирусная ДНК может не обнаруживаться в сыворотке крови [30, 40]. Таким образом, инфекциозность лиц с ЛГВ колеблется с течением времени. Тем не менее того небольшого количества вируса, которое содержится в сыворотке крови инфицированного донора, достаточно для развития острого гепатита В у реципиента. Доноры, в крови которых содержатся ДНК ВГВ и анти-НВс, но нет антител к поверхностному белку, представляют более высокую инфекционную опасность, чем доноры, которые имеют и анти-НВс [32]. На модели шимпанзе показано, что минимальная половинная инфекционная доза ВГВ составляет примерно 10 копий [41], но для людей это не установлено [32]. Последние оценки случаев передачи ВГВ от доноров крови с ЛГВ показали, что одна половинная инфекционная доза составляет 1000 вирусных частиц [42]. Вероятность развития острого гепатита зависит от вирусной нагрузки, количества перелитой плазмы, иммунокомпетентности реципиента, а также серологического статуса по ВГВ (наличие/отсутствие анти-НВс и/или анти-НВс) как донора, так и реципиента. Отсутствие развития острого гепатита у реципиента не исключает передачи ВГВ.

ВГВ передается от донора с ЛГВ при трансплантации печени реципиентам без инфекции ВГВ с развитием гепатита *de novo* [7, 43]. Это очевидно, поскольку гепатоциты являются резервуаром ковалентно замкнутой кольцевой ДНК вируса. Реже ВГВ передается при трансплантации почек, сердца и костного мозга [7]. Рекомендована профилактика вирусного гепатита В у НВсAg-отрицательных пациентов, которым планируется пересадка печени от анти-НВс-положительных доноров: в первую очередь путем вакцинации, а при ограниченном времени — с помощью специфического иммуноглобулина, ламивудина или их сочетания. Такая профилактика эффективно предотвращает гепатит у реципиентов [44], но избежать реактивации уже имеющейся инфекции ВГВ сложно [43].

Известное явление — реактивация ВГВ у больных с заболеваниями иммунной системы или получающих иммуносупрессивную терапию и/или химиотерапию [45]. Интерес к этому явлению растет благодаря новым иммуномодулирующим препаратам. Часто ВГВ активизируется у НВсAg-положительных лиц на фоне иммуносупрессии и характеризуется молниеносным течением гепатита [46, 47]. Применение ингибиторов гистондеацетилазы может приводить к реактивации ВГВ [48], что подтверждает участие эпигенетических механизмов в борьбе с этим вирусом.

Реактивация вируса у больных с ЛГВ наблюдается реже, чем у больных НВсAg-положительным гепатитом В, и зависит от ряда факторов. Заболевания системы крови, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и применение ритуксимаба повышают риск реактивации ЛГВ [7, 49, 50]. У пациентов с ЛГВ серологический профиль в отношении ВГВ может меняться в случае ослабления иммунитета. На фоне иммуносупрессивной терапии перестают выявляться антитела к НВсAg. В двух независимых исследованиях показано, что после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов происходила повторная сероконверсия НВсAg, хотя клинически типичный острый гепатит развивался редко [51, 52], поэтому большинство таких случаев могло быть пропущено.

Алгоритм обследования больных при поступлении в гематологический стационар должен включать исследование на ДНК ВГВ, анти-НВс и анти-НВс, помимо регламентированного тестирования на НВсAg, что позволит уже при поступлении в лечебное учреждение обнаруживать инфекцию ВГВ у пациентов. В ходе лечения больных заболеваниями системы крови необходимо непрерывно следить за маркерами ВГВ [53]. Это обеспечит контроль клинико-эпидемиологической ситуации в гематологическом отделении, позволяя выявить либо первичное внутрибольничное заражение пациента, либо реактивацию латентной инфекции в процессе лечения [54], а также своевременно менять тактику терапии и планировать дальнейшие лечебные мероприятия.

Хорошо зарекомендовала себя профилактическая терапия аналогами нуклеозидов для предотвращения реактивации инфекции у НВсAg-положительных пациентов, получавших иммуносупрессивную терапию. Подобная терапия в случае подозрения на латентную инфекцию ВГВ при отсутствии НВсAg и возможном наличии анти-НВс по-прежнему является предметом дискуссии. Европейская ассоциация по изучению печени рекомендовала проводить у таких пациентов мониторинг активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и уровня ДНК ВГВ и в случае подтверждения реактивации ЛГВ до повышения активности АлАТ назначать терапию аналогами нуклеозидов [10]. Подобная тактика позволяет избежать повреждения печени и развития гепатита. Современные противовирусные

препараты позволяют эффективно лечить острые и тяжелые формы гепатита, в том числе возникающие вследствие реактивации ЛГВ, однако эффективность такой терапии зависит от сроков начала лечения [55].

## Сочетанные вирусные инфекции

При сочетанной вирусной инфекции активность ВГВ может быть снижена, в частности, вирус гепатита С (ВГС) подавляет репликацию ВГВ до точки, которая определяет развитие латентной формы гепатита. Исследования *in vitro* показали, что ядерный белок ВГС тормозит репликацию ВГВ [56] и ЛГВ наиболее распространена именно у ВГС-инфицированных пациентов [7, 9]. Тем не менее последующие исследования поставили под сомнение взаимодействие между этими вирусами. Эксперименты проводились с полноразмерным геномом ВГВ и репликоном ВГС (это исследование не ограничено одним белком ВГС), при этом не было отмечено никакого взаимовлияния между этими вирусами [57]. Сегодня нельзя сделать окончательный вывод о роли ВГС в индукции латентного течения вирусного гепатита В. У ВИЧ-инфицированных часто наблюдается как явная, так и латентная инфекция ВГВ, но нет никаких доказательств возможного прямого влияния ВИЧ на ВГВ.

У лиц, переболевших острым гепатитом, геномы ВГВ присутствуют в печени, при этом нет никаких клинических или биохимических признаков ее повреждения [58]. У сурков после выздоровления от острого гепатита на протяжении всей жизни сохранялось небольшое количество реплицирующегося вируса [17]. ЛГВ может способствовать прогрессированию вирусного гепатита С и связанных с ним хронических заболеваний печени или ускорять их, приводя к наиболее тяжелым формам [8, 10]. Показана связь между фазами подъема активности АлАТ и появлением циркулирующей ДНК ВГВ у больных хроническим гепатитом С, что предполагает активную роль репликации ВГВ в повреждении клеток печени [40]. Еще в 1990-х гг. было обнаружено негативное влияние ЛГВ на вирусологический ответ у больных хроническим гепатитом С при терапии интерфероном [6, 9].

С учетом гипотезы о том, что ЛГВ сама по себе не может вызывать тяжелого повреждения печени, трудно дать объяснение данным, свидетельствующим, что именно с этой формой гепатита связано прогрессирование фиброза и цирроза печени у пациентов с криптогенным заболеванием печени. Правда, часть таких случаев касается ранее продуктивной инфекции ВГВ в виде клинически выраженного гепатита с последующим переходом в ЛГВ [7, 9]. ЛГВ является фактором риска гепатоцеллюлярной карциномы как при наличии, так и в отсутствие инфекции ВГС [59]. В основе развития гепатоцеллюлярной карциномы лежат сложные и многофакторные патогенетические механизмы, и ВГВ участвует во многих из них.

## Заключение

Хроническая инфекция ВГВ оказывает проонкогенное воздействие посредством прямых и косвенных механизмов. Прямые канцерогенные механизмы связаны со способностью ВГВ интегрироваться в геном хозяина и экспрессировать белки, обладающие трансформирующим потенциалом. Последние данные указывают на связь между инфекцией ВГВ, в том числе ЛГВ, и такими злокачественными новообразованиями, как внутриспеченочная холангиокарцинома и неходжкинские лимфомы [60]. Онкогенные механизмы ВГВ в этих случаях еще не полностью выяснены, но происхождение опухоли из гепатоцитов и холангиоцитов и предполагаемый лимфотропизм ВГВ обеспечивают некоторую теоретическую основу этой гипотезы. Таким образом, изучение ЛГВ имеет фундаментальное значение и для общего понимания инфекции ВГВ.

### Информация об авторах

Туполева Татьяна Алексеевна (Tupoleva T. A.), кандидат медицинских наук, заведующая отделом вирусологической диагностики, врач-вирусолог ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ttupoleva@mail.ru

### Литература

- Лопаткина Т. Н., Волчкова Е. В., Абдурахманов Д. Т. и др. Реактивация HBV инфекции у больных с лимфомой. Медицинский совет 2013; 5–6:40–45.
  - Голосова Т. В., Сомова А. В., Туполева Т. А. и др. Тестирование доноров и эволюция посттрансфузионного гепатита. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии 1999; 9:32–36.
  - Туполева Т. А., Игнатова Е. Н., Гуляева А. А. и др. Скрининг донорской крови на антитела к ядерному антигену вируса гепатита В как инструмент повышения безопасности трансфузий для больных заболеваниями системы крови. Клиническая лабораторная диагностика 2016; 61:311–316.
  - Туполева Т. А., Романова Т. Ю., Гуляева А. А. Опасность передачи вирусов гепатитов В и С с кровью доноров. Гематология и трансфузиология 2017; 62:32–36.
  - Туполева Т. А., Гармаева Т. Ц., Куликов С. М. Протокол мониторинга вирусологического статуса больных заболеваниями системы крови с целью реализации стратегии повышения вирусной безопасности трансфузий // В кн.: Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови / Под ред. В. Г. Савченко. — М.: Практика, 2018; т. 1, с. 143–158.
  - Гармаева Т. Ц., Куликов С. М. Доноры и реципиенты компонентов крови как сцепленные объекты изучения в эпидемиологических популяционных исследованиях. Тер архив 2015; 87:134–138.
- Остальные источники см. в References.

### References

- EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. J Hepatol 2012; 57:167–185.
- Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2008; 49:652–657.

3. Cacciola I., Pollicino T., Squadrito G. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341:22–26. doi: 10.1056/NEJM199907013410104.
4. Wasley A., Kruszon-Moran D., Kuhnert W. et al. The prevalence of hepatitis B virus infection in the United States in the era of vaccination. *J Infect Dis* 2010; 202:192–201.
5. Lopatkina T. N., Volchkova E. V., Abdurakhmanov D. T. et al. HBV infection reactivation in lymphoma patients. *Medical Council, Russian Journal (Meditsinskiy sovet)* 2013; 5–6:40–5 (in Russian).
6. Raimondo G., Caccamo G., Filomia R. et al. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol* 2013; 35:39–52. doi:10.1007/s00281-012-0327-7.
7. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I. et al. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007; 46:160–170.
8. Pollicino T., Raffa G., Costantino L. et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 45:277–285. doi:10.1002/hep.21529.
9. Torbenson M., Thomas D. L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:479–486.
10. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50:22742. doi:10.1016/j.jhep.2008.10.001.
11. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol* 2005; 42:302–308. doi:10.1016/j.jhep.2004.12.015.
12. Penna A., Artini M., Cavalli A. et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996; 98:1185–1194. doi:10.1172/JCI118902.
13. Rehermann B., Ferrari C., Pasquinelli C. et al. The hepatitis B virus persists for decades after patients recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996; 2:1104–1108. doi: 10.1038/nm1096-1104.
14. Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G. et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology* 2004; 126:102–110. doi:10.1053/j.gastro.2003.10.048.
15. Wong D. K., Huang F. Y., Lai C. L. et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 54:829–836. doi:10.1002/hep.24551.
16. Zerbini A., Pilli M., Boni C. et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2008; 134:1470–1481. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.017>.
17. Mulrooney-Cousins P. M., Michalak T. I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J Gastroenterology* 2007; 13:5682–5686. DOI: 10.3748/wjg.v13.i43.5682.
18. Bes M., Vargas V., Piron M. et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J Hepatol* 2012; 56:765–774. doi: 10.1016/j.jhep.2011.11.011.
19. Stuart C., James W. T., Velema M. et al. Occult hepatitis B in persons infected with HIV is associated with low CD4 counts and resolves during antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2009; 81:441–445. DOI: 10.1002/jmv.21422.
20. Martin C. M., Welge J. A., Shire N. J. et al. Cytokine expression during chronic versus occult hepatitis B virus infection in HIV co-infected individuals. *Cytokine* 2009; 47:194–198. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.06.005>
21. Guidotti L. G., Chisari F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:65–91. DOI:10.1146/annurev.immunol.19.1.65.
22. Lucifora J., Durantel D., Testoni B. et al. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology* 2010; 51:63–72. DOI: 10.1002/hep.23230.
23. Levrero M., Pollicino T., Petersen J. et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51:581–592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022>.
24. Lieberman P. M. Chromatin organization and virus gene expression. *J Cell Physiol* 2008; 216:295–302. DOI: 10.1002/jcp.21421.
25. Bloom D. C., Giordani N. V., Kwiatkowski D. L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799:246–256. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.12.001>.
26. Takacs M., Banati F., Koroknai A. et al. Epigenetic regulation of latent Epstein–Barr virus promoters. *Bioch Bioph Acta* 2010; 1799:228–235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.10.005>
27. Cougot D., Allemand E., Riviere L. et al. Inhibition of PP1 phosphatase activity by HBx: A mechanism for the activation of hepatitis B virus transcription. *Sci Signal* 2012; 5(205):ra1. DOI: 10.1126/scisignal.2001906.
28. El Chaar M., Candotti D., Crowther R. A. et al. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2010; 52:1600–1610. DOI:10.1002/hep.23886
29. Pollicino T., Amaddeo G., Restuccia A. et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. *Hepatology* 2012; 56:434–443. DOI:10.1002/hep.25592.
30. Hollinger F. B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion* 2008; 48:1001–1026. DOI:10.1111/j.1537-2995.2008.01701.x.
31. Candotti D., Allain J. P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51:798–809. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.020>.
32. Allain J. P., Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol* 2011; 18:461–466. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32834bac10.
33. Hollinger F. B., Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. *J Viral Hepat* 2010; 17:1–15. DOI:10.1111/j.1365-2893.2009.01245.x.
34. Golosova T. V., Somova A. V., Tupoleva T. A. et al. Testing of donors and the evolution of posttransfusion hepatitis. *The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology (Rossijskij zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii)* 1999; 9:32–36 (in Russian).
35. Allain J. P., Belkhir D., Vermeulen M. et al. Characterization of occult hepatitis B virus strains in South African blood donors. *Hepatology* 2009; 49:1868–1876. DOI: 10.1002/hep.22879.
36. Stramer S. L., Wend U., Candotti D. et al. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. *N Engl J Med* 2011; 364:236–247. DOI: 10.1056/NEJMoa1007644.
37. Esposito A., Sabia C., Iannone C. et al. Occult hepatitis infection in transfusion medicine: screening policy and assessment of current use of anti-HBc testing. *Transfus Med Hemother* 2017; 44:263–272. doi:10.1159/000460301.
38. Tupoleva T. A., Romanova T. Yu., Gulyaeva A. A. et al. Danger of transmission of hepatitis B and C through blood donor. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)* 2017; 61:311–316 (in Russian).

39. Tupoleva T. A., Ignatova E. N., Gulyaeva A. A. et al. Screening of blood donations for antibodies to nuclear antigen of hepatitis B virus as a tool to improve the safety of blood transfusion for patients of hematology clinic. *Russian Journal of Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)* 2016; 62:32–36 (in Russian).
40. Chemin I., Guillaud O., Queyron P. C. et al. Close monitoring of serum HBV DNA levels and liver enzymes levels is most useful in the management of patients with occult HBV infection. *J Hepatol* 2009; 51:824–825. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.06.007>
41. Komiya Y., Katayama K., Yugi H. et al. Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C. *Transfusion* 2008; 48:286–294. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01522.x
42. Allain J. P., Mihaljevic I., Gonzalez-Fraile M. I. et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion* 2013; 53:1405–1415. DOI: 10.1111/trf.12096.
43. Cheung C. K., Lo C. M., Man K. et al. Occult hepatitis B virus infection of donor and recipient origin after liver transplantation despite nucleoside analogue prophylaxis. *Liver Transplant* 2010; 16:1314–1323. DOI: 10.1002/lt.22169.
44. Cholongitas E., Papatheodoridis G. V., Burroughs A. K. Liver grafts from anti-hepatitis B core positive donors: a systematic review. *J Hepatology* 2010; 52:272–279. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.009>.
45. Wang Y., Luo X. M., Yang D. et al. Testing for hepatitis B infection in prospective chemotherapy patients: A retrospective study. *World J Gastroenterol* 2013; 19:923–930. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i6.923>
46. Kusumoto S., Tanaka Y., Mizokami M. et al. Reactivation of hepatitis B virus following systemic chemotherapy for malignant lymphoma. *Inter J Hematol* 2009; 90:13–23. DOI: 10.1007/s12185-009-0359-5.
47. Lalazar G., Rund D., Shouval D. Screening, prevention and treatment of viral hepatitis B reactivation in patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* 2007; 136:699–712. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06465.x.
48. Ritchie D., Piekarcz R. L., Blombery P. et al. Reactivation of DNA viruses in association with histone deacetylase inhibitor therapy: a case series report. *Haematologica* 2009; 94:1618–1622. doi:10.3324/haematol.2009.008607.
49. Pei S. N., Chen C. H., Lee C. M. et al. Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-based regimens: a serious complication in both HBsAg-positive and HBsAg-negative patients. *Ann Hematol* 2010; 89:255–2. doi: <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0806-7>.
50. Yeo W., Chan T. C., Leung N. W. et al. Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J Clin Oncol* 2009; 27:605–611. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.0182
51. Onozawa M., Hashino S., Izumiyama K. et al. Progressive disappearance of anti-hepatitis B surface antigen antibody and reverse seroconversion after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with previous hepatitis B virus infection. *Transplantation* 2005; 79:616–619. DOI: 10.1097/01.TP.0000151661.52601.FB
52. Viganò M., Vener C., Lampertico P. et al. Risk of hepatitis B surface antigen seroreversion after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46:125–131. DOI:10.1038/bmt.2010.70
53. Tupoleva T. A., Garmoeva T. Ts., Kulikov S. M. Protocol for monitoring the virologic status of patients with blood system diseases in order to implement a strategy to increase the viral safety of transfusions // In: *Diagnostic algorithms and protocols for the treatment of diseases of the blood system* / Ed. V. G. Savchenko. — M.: Practice, 2018; v. 1, p. 143–158 (in Russian).
54. Garmoeva T. Ts., Kulikov S. M. Blood component donors and recipients as linked study objects in epidemiological population-based surveys. *Therapeutic archive (Terapevticheskiy arkhiv)* 2015; 87:134–138 (in Russian).
55. Sanchez M. J., Buti M., Homs M. et al. Successful use of entecavir for a severe case of reactivation of hepatitis B virus following polychemotherapy containing rituximab. *J Hepatol* 2009; 51:1091–1096. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.07.012
56. Raimondo G., Cacciato G., Saitta C. Hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infection: additive players in chronic liver disease. *Ann Hepatol* 2005; 4:100–106.
57. Bellecave P., Gouttenoire J., Gajer M. et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference. *Hepatology* 2009; 50:46–55. DOI: 10.1002/hep.22951.
58. Raimondo G., Navarra G., Mondello S. et al. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. *J Hepatol* 2008; 48:743–746. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.023>.
59. Shi Y., Wu Y. H., Wu W. et al. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver Intern* 2012; 32:231–240. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02481.x
60. Fwu C. W., Chien Y. C., You S. L. et al. Hepatitis B virus infection and risk of intrahepatic cholangiocarcinoma and non-Hodgkin lymphoma: a cohort study of parous women in Taiwan. *Hepatology* 2011; 53:1217–1225. DOI: 10.1002/hep.24150.

# ЭНТЕРОБАКТЕРИИ С ПРОДУКЦИЕЙ $\beta$ -ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА: ИСТОЧНИКИ ИНФИЦИРОВАНИЯ И ЗНАЧЕНИЕ КОЛОНИЗАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: sources of infection and the value of intestinal colonization in patients with hematological malignancies

Коробова А. Г., Клясова Г. А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Korobova A. G., Klyasova G. A.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

## РЕЗЮМЕ

В последние годы в этиологии инфекционных осложнений возрастает роль полирезистентных бактерий, среди которых ведущую позицию занимают энтеробактерии, продуцирующие  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра (БЛРС). Одной из главных проблем в лечении инфекционных осложнений, вызванных этими бактериями, является их устойчивость ко многим антимикробным препаратам. У больных гемобластозами и нейтропенией преобладает эндогенный путь развития инфекции, при котором происходит транслокация микроорганизмов со слизистой оболочки кишечника в кровоток. В статье рассмотрены источники инфицирования энтеробактериями с продукцией БЛРС, частота их выявления, показана необходимость проведения мониторинга в период химиотерапии гемобластозов.

**Ключевые слова:** обзор;  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра; энтеробактерии; колонизация; источники инфицирования

**Для цитирования:** Коробова А. Г., Клясова Г. А. Энтеробактерии с продукцией  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра: источники инфицирования и значение колонизации слизистой оболочки кишечника у больных гемобластозами. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(1):174–183

doi: 10.25837/HAT.2018.78..2..008

## ABSTRACT

In recent years, the incidence of infections caused by multidrug-resistant bacteria, particularly by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E), has increased. One of the major issues in the treatment of infections caused by these pathogens is their resistance to many antimicrobial agents. In patients with hematological malignancies, the most common source of infection is their own intestinal flora, which gets translocated from the intestinal mucosa into the bloodstream. The article discusses the prevalence and sources of infection with ESBL-E, as well as the necessity of monitoring of gut colonization with these bacteria during chemotherapy.

**Keywords:** overview; ESBL; extended-spectrum beta-lactamase; *Enterobacteriaceae*; colonization; sources of infection

**For citation:** Korobova A. G., Klyasova G. A. *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: sources of infection and the value of intestinal colonization in patients with hematological malignancies*. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (*Gematologiya i transfuziologiya*). 2018; 62(3):174–183 (in Russian) doi: 10.25837/HAT.2018.78..2..008

**For correspondence:** Korobova Anna G., researcher of scientific clinical laboratory of clinical bacteriology, mycology and antibiotic therapy of National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: korobova.a@blood.ru

**Для корреспонденции:** Коробова Анна Геннадьевна, научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России  
Электронная почта: korobova.a@blood.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.11.17

Принята к печати 16.05.18

**Information about authors:**

Korobova A. G., <http://orcid.org/0000-0002-6268-5282>;  
ResearcherID: M-6469-2014;

Klyasova G. A., <http://orcid.org/0000-0001-5973-5763>;  
ResearcherID: M-6329-2014.

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 24 Nov 2017

Accepted 16 May 2018

**С**овременные программы химиотерапии позволяют достичь высокой общей выживаемости у больных гемобластозами, но наряду с успехами в лечении у больных увеличивается риск тяжелых инфекционных осложнений, частота которых достигает 80—90% [1]. Одним из частых тяжелых осложнений у иммунокомпрометированных больных является бактериемия. В настоящее время в структуре возбудителей бактериемии отмечена тенденция к увеличению доли грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* (33,4%), из них основную часть составляют *Escherichia coli* (18,6%) и *Klebsiella pneumoniae* (7,3%) [2]. Среди энтеробактерий с высокой частотой (43%) встречаются изоляты, продуцирующие β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС). Продукция БЛРС определялась у 63% изолятов *K. pneumoniae* и у 36% изолятов *E. coli*.

Продукция БЛРС является одним из наиболее распространенных механизмов резистентности у энтеробактерий. Ферменты БЛРС отвечают за гидролиз таких β-лактамов антибиотиков, как цефалоспорины III—IV поколений, которые длительное время составляли основу лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. В отношении продуцентов БЛРС активность проявляют ограниченное число антибиотиков. Инфекционные осложнения, вызываемые энтеробактериями с продукцией БЛРС, характеризуются тяжелым течением, удлинением периода госпитализации, высокой смертностью и увеличением затрат на лечение. Одна из ведущих причин высокой смертности — неадекватная стартовая терапия противомикробными препаратами.

У больных гемобластозами преобладает эндогенный путь развития инфекционных осложнений, при котором происходит транслокация бактерий со слизистой оболочки кишечника в кровоток [3]. К факторам риска, индуцирующим колонизацию слизистой энтеробактериями с продукцией БЛРС, относят применение антибиотиков, в особенности цефалоспоринов III поколения, неадекватную антимикробную терапию, длительную госпитализацию, пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии, использование инвазивных методов исследования [4, 5]. Как

правило, у больных гемобластозами в период проведения химиотерапии присутствует сразу несколько факторов риска: длительное (иногда 6—10 мес) пребывание больного в стационаре; тяжелое течение опухолевого заболевания, для адекватной терапии которого необходимо проведение инвазивных исследований; наличие сосудистых доступов.

## Распространение БЛРС среди клинически значимых энтеробактерий

Впервые энтеробактерии с продукцией БЛРС были обнаружены исследователями в начале 1980-х гг. в Европе. В 1983 г. было опубликовано первое сообщение о выявлении энтеробактерий, устойчивых к цефалоспорином III поколения, и впоследствии у этих изолятов была выявлена продукция фермента SHV-2, который отнесли к БЛРС [6]. В течение короткого времени произошло широкое распространение бактерий, продуцирующих β-лактамазы, которые способны разрушать цефалоспорины расширенного спектра действия.

С каждым годом растет число публикаций, в которых представлены результаты изучения энтеробактерий с продукцией БЛРС, включающие частоту встречаемости этих ферментов у энтеробактерий, а также молекулярные характеристики БЛРС-продуцентов, выделенных в стационарах разных стран и среди разных групп населения. В 2004 г. было проведено многоцентровое исследование SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends), в котором участвовал 81 медицинский центр из 28 стран мира, расположенных на пяти континентах [7]. По данным этого исследования, наибольшая частота выявления БЛРС-положительных бактерий среди нозокомиальных штаммов *E. coli* и *Klebsiella* spp. отмечена в Латинской Америке (12 и 27,6% соответственно) и Азии (19,6 и 22,9%), реже в Европе (6,4 и 8,8%) и в Северной Америке (2,8 и 5,3% соответственно). Существенное увеличение доли энтеробактерий, устойчивых к цефалоспорином III поколения, было отражено в отчете ВОЗ об устойчивости нозокомиальных и внебольничных штаммов бактерий к антибиотикам, опубликованном в 2014 г. и включавшем результаты исследований из 129 стран мира [8].

Во многих странах частота обнаружения таких микроорганизмов превысила 50%, причем в Латинской Америке этот показатель составил 71%, а в странах Юго-Восточной Азии достиг 95%. Минимальная доля продуцентов БЛРС была зарегистрирована в Канаде (до 9%) и в США (до 23%).

Существенное увеличение за последние 10 лет доли энтеробактерий, устойчивых к цефалоспорином III поколения, среди возбудителей нозокомиальных инфекций можно проследить по данным европейского отчета о резистентности, которые представлены в системе мониторинга антибиотикорезистентности EARS-Net (Antimicrobial resistance surveillance in Europe, <http://ecdc.europa.eu/>). В 2004 г. лишь у некоторых изолятов *E. coli* была выявлена продукция БЛРС, только в единичных странах продуценты БЛРС определялись в большем количестве, например, в Румынии от 25 до 50%; тогда как по результатам 2014 г. было отмечено существенное увеличение числа стран, где доля нечувствительных к цефалоспорином изолятов достигла 50%. В 2004 г. информация о наличии штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых к антибиотикам, была получена из небольшого числа стран, но уже в 2014 г. отмечено угрожающее распространение продуцентов БЛРС во многих странах. В 15 странах Европы частота выявления БЛРС у *K. pneumoniae* составила 85% и выше, среди этих стран были Испания, Португалия, Швеция, Эстония, Латвия и другие; меньше всего доля продуцентов БЛРС была в Исландии — менее 1% [9].

В России сообщения о выделении первых энтеробактерий с продукцией БЛРС относятся к 1990-м гг. В 1996 г. в Санкт-Петербурге изоляты *Salmonella typhimurium* с продукцией БЛРС были выделены из образцов кала у четырех членов одной семьи при гастроэнтерите [10]. В тот же период (1997—1998 гг.) в первых многоцентровых исследованиях (программа «Micromax»), посвященных этой проблеме, было показано, что в отделениях реанимации и интенсивной терапии ряда учреждений распространенность БЛРС среди *E. coli* приближалась к 50%, а среди *Klebsiella* spp. превышала 90% [11]. По результатам другого многоцентрового исследования, ROSNET, в котором провели сравнение двух периодов, 2002—2004 гг. и 2006—2007 гг., по выявлению БЛРС среди нозокомиальных изолятов энтеробактерий, полученных из 36 различных стационаров России, было отмечено увеличение доли продуцентов БЛРС среди энтеробактерий с 52,3 до 69,3% [12]. При этом у штаммов *E. coli* этот показатель увеличился с 49,2 до 67,4%, а у *Klebsiella* spp. — с 81,2 до 90%. В исследовании 2011—2012 гг. продукция БЛРС была обнаружена у 78,2% всех нозокомиальных изолятов энтеробактерий, в том числе у 90,6% *K. pneumoniae* и 82,1% *E. coli* [13].

Отмечено меньшее распространение продуцентов БЛРС среди энтеробактерий, выделенных из гемокультуры у больных гемобластомами. В 2007 г. были

опубликованы результаты многоцентрового исследования 640 возбудителей сепсиса, выделенных из гемокультуры у 478 больных с опухолями системы крови, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях 7 лечебных учреждений 5 городов России с 2003 по 2005 г. [14]. Среди грамотрицательных бактерий чаще выделяли микроорганизмы, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae* (32,4%), из них продуценты БЛРС составляли 36%. Продукция БЛРС определялась у 62% штаммов *K. pneumoniae* и у 36% — *E. coli*.

Среди возбудителей инфекций наибольшее распространение получили штаммы энтеробактерий с продукцией β-лактамаз типов TEM, SHV и CTX-M. В 1990-е гг. среди возбудителей нозокомиальных инфекций чаще встречались энтеробактерии, продуцирующие БЛРС типов TEM и SHV. За последнее время произошло быстрое распространение БЛРС типа CTX-M, эти β-лактамазы были выявлены в разных регионах мира и во многих странах стали доминирующими среди БЛРС. По данным Edelstein et al. [15], в 1997—1998 гг. продукция β-лактамаз типа CTX-M была выявлена у 35,3% изолятов энтеробактерий, продуцирующих БЛРС, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии в разных регионах России, а к 2003 г. их доля составляла уже 80,4% [16]. Похожие тенденции были отмечены в европейских странах: в Австрии частота выявления ферментов типа CTX-M у продуцентов БЛРС возросла с 0% в 1998 г. до 85% в 2004 г., в Италии — с 12,5 до 38,2% соответственно [17]. Полагают, что важную роль в повсеместном распространении генов *CTX-M* играют такие биологические факторы, как локализация генов на конъюгативных плаزمиде и наличие эффективных мобильных генетических элементов. Эти мобильные генетические элементы способствуют быстрой передаче генетической информации от одного микроорганизма к другому, что приводит к широкому распространению β-лактамаз CTX-M во всем мире [18].

Повсеместное распространение резистентности к антимикробным препаратам среди возбудителей инфекционных осложнений у больных гемобластомами способствовало пересмотру традиционной стратегии назначения антимикробных препаратов в гематологии. В международных рекомендациях экспертов ESCIL-4 (European Conference on Infections in Leukaemia) [19], выпущенных в 2013 г., впервые помимо эскалационного подхода была предложена стратегия деэскалации антимикробной терапии в период гранулоцитопении у больных гемобластомами, которая раньше использовалась лишь у тяжелых больных в отделениях реанимации. При деэскалационном подходе в качестве препаратов для первого этапа терапии рекомендовано применять антибиотики с более широким спектром действия, включая активность против энтеробактерий с продукцией БЛРС и/или полирезистентных

штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, такие как карбапенем с антипсевдомонадной активностью или сочетание  $\beta$ -лактамов антибиотиков с колистином. В дальнейшем можно провести деэскалацию антимикробной терапии в соответствии с результатами микробиологических исследований. При этом показаниями к использованию деэскалационного подхода у больных с фебрильной нейтропенией являются не только септический шок или тяжело протекающая пневмония, но и колонизация полирезистентными микроорганизмами или вызванная ими предшествующая инфекция. Впервые в гематологии в качестве препаратов для первого этапа терапии при деэскалационном подходе было рекомендовано применение карбапенемов в центрах с высокой долей инфекций, вызванных энтеробактериями с продукцией БЛРС (уровень доказательности ВП), или у больных, колонизированных такими микроорганизмами (уровень доказательности ВП). Однако такой подход к лечению не лишен негативных последствий, так как широкое применение карбапенемов и колистина может привести к развитию устойчивости у бактерий и к этим антибиотикам.

## Источники инфицирования энтеробактериями в стационаре

Развитие тяжелых инфекционных осложнений у иммунокомпрометированных больных происходит как при эндогенном, так и при экзогенном варианте инфицирования микроорганизмами. Эндогенная транслокация бактерий происходит, как правило, через слизистую оболочку пищеварительного тракта, повреждаемую цитостатическими препаратами или опухолью. Экзогенная передача внутрибольничных возбудителей происходит из окружающей среды, от одного больного другому или через руки медперсонала. Этому способствуют длительное пребывание больного в стационаре, тяжелое течение опухолевого заболевания, для адекватной терапии которого необходимо проведение инвазивных исследований, а также наличие сосудистых доступов. Рассматривают и смешанный механизм инфицирования, когда под воздействием антимикробных препаратов ранее чувствительные к антибиотикам эндогенные штаммы бактерий приобретают детерминанты устойчивости и, попадая в окружающую среду, способны сохраняться в условиях стационара и распространяться от одного больного к другому.

Для определения источника инфекции и своевременного предотвращения ее дальнейшего распространения важно проводить молекулярные исследования возбудителей инфекционных осложнений в стационаре. Большинство вспышек внутрибольничных инфекций характеризуется наличием ограниченного числа эпидемических клонов, что подтверждает экзогенную передачу эпидемических штаммов. Распространение генетически родственных изолятов характерно

прежде всего для отделений реанимации и неонатологии [20]. По результатам работы Paniara et al. [21], при генотипировании семи неповторяющихся изолятов *K. pneumoniae*, выделенных от больных в отделении реанимации в течение одного месяца, была подтверждена циркуляция единственного эпидемического клона. Важной частью эпидемического исследования является выявление источника инфекции. Ganeswire et al. [22] описали 11 случаев выявления *Enterobacter gergoviae* из гемокультуры у новорожденных, произошедшие в течение 12 дней. Авторы провели генотипирование изолятов *E. gergoviae*, выделенных из крови, а также полученных при исследовании смывов с рук медицинского персонала и из окружающей среды. Резервуаром инфекции оказался физиологический раствор, контаминированный *E. gergoviae*, а передача инфекции происходила через руки медицинского персонала. Интересные результаты были получены Adler et al. [23] при анализе изолятов энтеробактерий с продукцией БЛРС, полученных из мазков со слизистой кишечника больных, находящихся на лечении в стационаре ( $n = 194$ ), ухаживающих за ними родственников ( $n = 26$ ) и медицинского персонала ( $n = 35$ ). Генетическое сходство с изолятами, полученными от больного, наблюдалось у 23 (88%) из 26 изолятов, выявленных у родственников, и только у 6 (19%) из 32 изолятов *E. coli*, выделенных от медицинского персонала. Таким образом, крайне важно организовать надлежащий уход за больными не только со стороны медицинского персонала, но и со стороны родственников, а соблюдение мер безопасности снижает возможность передачи возбудителей внутри стационара от одного больного другому.

Источником инфицирования в стационаре могут быть также продукты питания. В Испании была зарегистрирована инфекционная вспышка, вызванная клоном *K. pneumoniae*, продуцирующим  $\beta$ -лактамазы SHV-1 и CTX-M-15 [24]. Источником инфекции оказались сотрудники пищеблока больницы: колонизацию продуцентами БЛРС выявили у 6 (14%) из 44 работников, передача возбудителей проходила через продукты питания. Проведенные исследования показывают, что частота передачи резистентных штаммов гораздо выше при уходе за больными на дому, чем в стационаре [25]. Вполне определенно, что при соблюдении норм гигиены значительно снижается вероятность передачи устойчивых к антибиотикам бактерий через руки медицинского персонала, а резервуарами возбудителей могут быть разные источники, включая физиологические растворы, дистиллированную воду, щетки для мытья рук, контейнеры с мылом [26]. Соблюдение профилактических мер, таких как дезинфекция рук, предметов ухода за больным, медицинского оборудования, раковин, играет важную роль в предотвращении передачи возбудителей инфекции.

При анализе генетического родства клинически значимых энтеробактерий, продуцирующих БЛРС,

полученных в процессе длительных наблюдений, часто обнаруживают поликлональность изолятов. В университетском госпитале Мадрида было проведено молекулярно-генетическое исследование клинически значимых изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae* с продукцией БЛРС, полученных в течение 12 лет [27]. Авторы отметили генетическое разнообразие энтеробактерий с продукцией БЛРС, что подтверждает наличие нескольких источников, формирующих пул резистентных микроорганизмов в стационаре. Такими источниками могут быть как эпидемические клоны, так и ранее чувствительные эндогенные штаммы бактерий с приобретенными детерминантами устойчивости, которые впоследствии могут передаваться от одного микроорганизма другому с помощью мобильных генетических элементов.

Поликлональность изолятов, выделенных из гемокультуры больных гематологическими заболеваниями, была подтверждена в исследовании, проведенном в ФГБУ «НМИЦ гематологии» в 2003–2006 гг. [28]. Среди изученных грамтрицательных бактерий ( $n = 152$ ) доминирующий клон отсутствовал, идентичные бактерии в одном клоне были представлены ограниченным числом изолятов, и было сделано заключение о наличии двух вариантов инфицирования в стационаре — эндогенном и экзогенном, с преобладанием эндогенного. Однако для штаммов *E. coli* наиболее характерным было эндогенное инфицирование, а экзогенный путь передачи инфекции чаще определялся у *P. aeruginosa*, поскольку генетически родственные изоляты среди изолятов *P. aeruginosa* выявляли достоверно чаще, чем среди изолятов *E. coli* (35 и 3% соответственно;  $p < 0,001$ ).

Анализ генетического родства идентичных по виду энтеробактерий с продукцией БЛРС, выделенных у одного и того же больного из гемокультуры и со слизистой прямой кишки, позволяет подтвердить или опровергнуть эндогенный путь инфицирования. Число публикаций по молекулярным исследованиям в этой области ограничено. По данным Cuartero et al. [29], у одного из 12 больных с колонизацией *E. coli*, продуцирующими БЛРС, развилась бактериемия, вызванная идентичными по виду бактериями. Методом гель-электрофореза в пульсирующем поле (пульс-электрофореза) исследователи подтвердили генетическое родство изолятов, полученных из гемокультуры и со слизистой прямой кишки у этого больного.

Аналогичное исследование проводили в университетском медицинском центре в Мичигане [30], в процессе которого изучали колонизацию слизистой кишечника и инфицирование, вызванное изолятами *K. pneumoniae*, у онкогематологических больных и больных из отделения реанимации. Колонизация *K. pneumoniae* была выявлена у 406 (23%) из 1765 больных, а последующее инфицирование идентичными по виду изолятами — у 21 (5,2%) из 406 больных. Авто-

рами было проведено попарное генотипирование изолятов *K. pneumoniae*, полученных из жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) ( $n = 7$ ), из мочи ( $n = 4$ ), из гемокультуры ( $n = 5$ ) и со слизистой прямой кишки у тех же больных ( $n = 16$ ). Всего было проанализировано 32 генетических профиля. Генетически родственными по результатам мультилокусного секвенирования-типирования и полногеномного секвенирования были изоляты, выявленные из мочи больных, и парные им изоляты, полученные со слизистой прямой кишки, а также изоляты, полученные из жидкости БАЛ и со слизистой прямой кишки. Только в 2 из 5 случаев бактериемии изоляты из гемокультуры были генетически родственны изолятам, выделенным со слизистой кишечника. Авторы объясняют низкий процент сходства парных изолятов при бактериемии тем, что в отделении реанимации происходит экзогенное инфицирование венозных катетеров изолятами *K. pneumoniae* или инфицирование через руки медицинского персонала. Можно полагать, что для отделений реанимации более характерно экзогенное инфицирование полирезистентными бактериями.

В исследовании Samet et al. [31] были проанализированы повторные случаи бактериемии у больных лейкозами. Неоднократное выделение *E. coli* из гемокультуры отмечалось у 6 больных гематологическими заболеваниями, и только у 3 больных повторные эпизоды бактериемии были вызваны генетически родственными изолятами *E. coli*, т. е. в половине случаев повторные эпизоды бактериемии были вызваны новыми возбудителями. В этой работе также было проведено генотипирование изолятов *E. coli*, выделенных в повторных исследованиях из образцов кала, которое показало, что у больных с гемобластозами в течение нескольких недель происходит смена одного генотипа *E. coli* на другой. Авторы исследования объясняют полученные результаты изменчивостью кишечной микрофлоры у больных гемобластозами, возникающей под воздействием ряда факторов, наиболее значимыми из которых являются антибиотики и цитостатические препараты, приводящие к селекции наиболее резистентных изолятов. Следовательно, в кишечнике могут находиться одновременно несколько разных штаммов энтеробактерий одного вида.

Это заключение было подтверждено в исследовании, проведенном Krawczyk et al. [32], включавшем 115 больных гемобластозами. У каждого больного был выделен один изолят *E. coli* из гемокультуры и от трех до десяти фенотипически разных изолятов *E. coli* со слизистой кишечника. Молекулярно-генетическое исследование доказало, что 89 (77%) из 115 изолятов *E. coli* из гемокультуры были генетически родственны изолятам *E. coli*, полученным со слизистой прямой кишки. Также у всех изолятов *E. coli*, включенных в исследование, изучали гены вирулентности, кодирующие такие факторы, как Dg-адгезин, F1C-фимбрии

и другие. Генетически родственные изоляты из крови и со слизистой кишечника имели идентичные наборы генов вирулентности. Изоляты из гемокультуры статистически значимо чаще имели гены вирулентности, кодирующие Dr-адгезин, по сравнению с изолятами, выделенными со слизистой кишечника у того же больного, но не являющимися генетически родственными (16 и 5% соответственно;  $p = 0,009$ ). И наоборот, гены, кодирующие FIC-фимбрии, значимо чаще выявляли у изолятов *E. coli*, которые были получены со слизистой кишечника и не являлись генетически родственными изоляту из гемокультуры (36 и 17%;  $p = 0,001$ ). Это исследование продемонстрировало, что в кишечнике у больного могут постоянно находиться несколько разных штаммов энтеробактерий одного вида, а наличие генов вирулентности у штаммов *E. coli*, колонизирующих слизистую кишечника, может быть дополнительным фактором, предрасполагающим к транслокации энтеробактерий со слизистой в кровотоки.

### **Значение колонизации слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС**

В случае эндогенного инфицирования происходит транслокация бактерий со слизистой кишечника в кровотоки. В связи с этим у больных гемобластозами с персистирующей фебрильной нейтропенией и отсутствием микробиологического подтверждения инфекции из значимых локусов следует принимать во внимание колонизацию слизистой кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при модификации противомикробной терапии.

Частота выявления колонизации слизистой прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных при поступлении в стационар варьирует в разных центрах. В публикациях представлены результаты исследований, проведенных, как правило, у больных в многопрофильных стационарах, а не у отдельных категорий больных. В Нидерландах этот показатель составил 8,2%, причем отличия были незначительны у больных, госпитализированных из дома (7,9%) и длительно получавших медицинскую помощь в реабилитационных центрах или на дому (8,6%) [33]. В многоцентровом исследовании, проведенном в пяти реабилитационных центрах Израиля, Франции, Испании и включающем данные о 2873 больных, частота колонизации продуцентами БЛРС составила 26% [34]. В странах Юго-Восточной Азии этот показатель был существенно выше. Mushtaq et al. [35] показали, что при поступлении в госпиталь Карачи (Пакистан) колонизация энтеробактериями с продукцией СТХ-М  $\beta$ -лактамаз типа СТХ-М выявлялась у 155 (88%) из 176 больных.

По результатам исследования, включавшего гематологических и онкологических больных из универ-

ситетского медицинского центра в Германии, колонизация слизистой прямой кишки энтеробактериями с продукцией БЛРС при поступлении в стационар определялась у 90 (17,5%) из 513 больных [36]. Аналогичные результаты были получены Arnan et al. [37] в Испании при исследовании мазков со слизистой кишечника у больных острыми лейкозами, при поступлении в стационар продуценты БЛРС были выявлены у 29 (17,9%) из 162 больных. Дальнейшее исследование выявило увеличение частоты колонизации во время лечения. При исследовании 217 эпизодов нейтропении колонизация БЛРС-положительными бактериями была выявлена в 63 (29%) из 217 случаев. По данным другого исследования [38], колонизация слизистой кишечника продуцентами БЛРС в процессе проведения химиотерапии была отмечена у 17 (27%) из 63 больных гемобластомами. Сопоставимые результаты были получены и в другой работе [39], в которой зарегистрировали увеличение случаев выявления продуцентов БЛРС у 154 больных гемобластомами с 14,3% при поступлении до 31,8% на момент завершения лечения.

Исследования, проведенные в многопрофильном стационаре Тель-Авива, показали, что колонизация слизистой кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС наблюдалась у 26 (10,8%) из 241 больного при госпитализации в стационар [40]. Впоследствии бактериемия (вызванная таким же видом бактерий) развилась у 4 (15,4%) из 26 больных с колонизацией продуцентами БЛРС и лишь у 1 (0,5%) из 215 больных без колонизации продуцентами БЛРС. Колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС явилась прогностическим фактором бактериемии, вызванной этими микроорганизмами (отношение шансов (ОШ) 38,9;  $p < 0,001$ ). Аналогичные результаты были получены и при исследовании у гематологических больных. В исследовании Liss et al. [36], опубликованное в 2012 г., было включено 513 больных гемобластомами и солидными опухолями. Микробиологическое исследование образцов кала проводили в течение 72 ч после госпитализации в стационар, и колонизация энтеробактериями с продукцией БЛРС была выявлена у 90 (17,5%) из 513 больных. В дальнейшем бактериемия, вызванная энтеробактериями с продукцией БЛРС, развилась у 6 (6,6%) из 90 больных с колонизацией и только у 2 (0,5%) из 423 больных без колонизации (ОШ 4,5). Похожие результаты были получены в проспективном исследовании, проведенном в «НМИЦ гематологии» в 2013–2015 гг. Бактериемия, вызванная энтеробактериями с продукцией БЛРС, выявлена у 5 (7,5%) из 68 больных с колонизацией этими микроорганизмами, тогда как ни у одного из 105 больных без колонизации этими бактериями не отмечалось бактериемии, вызванной продуцентами БЛРС ( $p = 0,009$ ) [41].

По результатам многих исследований доказано, что предшествующие госпитализации и длительное пребывание в стационаре увеличивают вероятность

колонизации слизистой кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС. В литературе представлено ограниченное число длительных мониторинговых исследований, рассматривающих зависимость частоты выявления от времени и изменение доли больных с колонизацией слизистой кишечника БЛРС-положительными микроорганизмами во время госпитализации. Среднее время пребывания больных в стационаре до момента выявления колонизации этими бактериями составляло от 11 до 67 дней [5]. В исследовании Bisson et al. [42] длительность госпитализации была значимо больше у больных с колонизацией, чем у больных без колонизации продуцентами БЛРС (23 и 8 дней соответственно;  $p = 0,01$ ). В другой работе значимым фактором риска колонизации слизистой кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС была длительность пребывания в стационаре более 21 дня ( $p < 0,001$ ) [43]. Таким образом, чем дольше период госпитализации больного, тем выше вероятность колонизации слизистой кишечника продуцентами БЛРС. Следует отметить, что длительность выделения таких бактерий со слизистой является переменной. Apisarnthanarak et al. [44] исследовали продолжительность колонизации БЛРС-штаммами в течение 6 мес после выписки больного из стационара. Медиана продолжительности колонизации составила 98 дней (разброс от 14 до 182 дней), причем колонизация значительно дольше сохранялась у больных, которые продолжали принимать антибиотики после выписки из стационара (154 и 56 дней соответственно;  $p = 0,04$ ). Titelman et al. [45] изучали продолжительность колонизации слизистой кишечника продуцентами БЛРС после регистрации инфекционного эпизода. Колонизация сохранялась у 51 (84%) из 61 больного в течение 1 мес, у 36 (66%) — в течение 3 мес, у 31 (55%) — в течение 6 мес, у 26 (43%) — в течение 12 мес. Интересным был тот факт, что во время наблюдения у 17 (28%) из 61 больного были выявлены новые штаммы, генетически неродственные первичным штаммам, а также другие виды БЛРС-положительных бактерий, не сходные с выявленными вначале. Выявление БЛРС-штаммов отмечалось не во всех последовательно взятых образцах, поэтому авторы сделали вывод, что по отсутствию искомым микроорганизмов в одном образце нельзя делать заключение об отсутствии колонизации слизистой кишечника, необходимо проводить повторные исследования.

Как было отмечено ранее, в развитии инфекционных осложнений у больных гемобластозами преобладает эндогенный путь инфицирования, при котором транслокация микроорганизмов со слизистой кишечника происходит в кровяной ток. В связи с этим больным нужно проводить селективную деконтаминацию кишечника, и препаратами выбора являются фторхинолоны. Согласно рекомендациям Первой Европейской конференции по инфекциям при лейкемии (European Conference on Infection in Leukemia,

ЕСIL-1), профилактика фторхинолонами может быть проведена больным группы высокого риска (больные острым лейкозом, реципиенты гемопоэтических стволовых клеток) в тех случаях, если у них ожидается гранулоцитопения длительностью от 7 дней и более после цитостатического воздействия [46]. Для профилактики фторхинолоны рекомендовано применять с первого дня химиотерапии до завершения гранулоцитопении (количество нейтрофилов  $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$ ) или назначения других антибиотиков. Эффективность профилактического применения фторхинолонов подтверждена в ряде исследований, в то же время зарегистрированы случаи суперинфекции на фоне профилактики фторхинолонами, обусловленные резистентными к ним штаммами *E. coli*, *P. aeruginosa*, метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* [47]. Неэффективность фторхинолонов при инфекционных осложнениях, обусловленных БЛРС-положительными энтеробактериями, отмечена в клинических исследованиях. Tumbarello et al. [48] были изучены факторы, оказавшие влияние на смертность в 186 случаях бактериемии, вызванной энтеробактериями с продукцией БЛРС (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*). Статистически значимыми прогностическими факторами летального исхода явились изначально неадекватная антимикробная терапия (ОШ 6,28;  $p < 0,001$ ) и невыявленный первичный очаг инфекции (ОШ 2,69;  $p = 0,004$ ). Неадекватная антимикробная терапия была назначена 89 (47,8%) из 186 больных, смертность в этой группе была статистически выше, чем у больных, которым исходно проводили адекватную терапию (59,5 и 18,5%; ОШ 2,38;  $p < 0,001$ ). Назначение цiproфлоксацина, исходно проявляющего активность *in vitro* против выделенных микроорганизмов, было отнесено к неадекватной антимикробной терапии, приводящей к увеличению смертности (ОШ 4,05;  $p < 0,001$ ). Полагают, что неудачи в применении цiproфлоксацина могут быть обусловлены особенностями фармакокинетики препарата, которая заключается в небольшой разнице между концентрацией цiproфлоксацина в крови и в тканях при использовании его в стандартных дозах. Концентрация препарата в тканях не всегда достигает значений минимальной подавляющей концентрации (МПК) цiproфлоксацина для конкретного микроорганизма [49]. При инфекционных осложнениях рекомендуемые терапевтические дозы цiproфлоксацина (400 мг 2 раза в сутки) будут эффективными только в отношении микроорганизмов, для которых МПК цiproфлоксацина составляет менее 0,03 мкг/мл [50]. Все вышесказанное ставит под сомнение целесообразность использования фторхинолонов (цiproфлоксацина, левофлоксацина, моксифлоксацина) для профилактики бактериальных инфекций у больных с колонизацией кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС.

Таким образом, можно отметить важность исследования колонизации слизистых кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС у больных гемобластозами в период гранулоцитопении. У больных гемобластозами возможен как эндогенный, так и экзогенный путь инфицирования при бактериемии, но основным фактором риска инфекций, вызванных продуцентами БЛРС, является предшествующая колонизация слизистой прямой кишки соответствующими по виду микроорганизмами. У значительного числа больных гемобластозами колонизация слизистой кишечника БЛРС-положительными бактериями регистрируется при поступлении в стационар, и доля больных с колонизацией возрастает во время лечения. Важным моментом является длительность сохранения колонизации слизистой кишечника, и в ряде случаев энтеробактерии с продукцией БЛРС продолжают выделяться в течение 12 мес. Выявление энтеробактерий с продукцией БЛРС на слизистой прямой кишки у больных гемобластозами и нейтропенией является значимым как для решения о возможности проведения профилактики, так и для модификации противомикробной терапии в случае неудач в лечении.

#### Информация об авторах

**Коробова Анна Геннадьевна** (Korobova A. G.), научный сотрудник научно-клинической лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, amalofeeva@yandex.ru

**Клясова Галина Александровна** (Klyasova G. A.), д. м. н., профессор, заведующая научно-клинической лабораторией клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, klyasova.g@blood.ru

#### Литература

1. Войцеховский В. В., Груздова А. В., Филатова Е. А. и др. Анализ инфекционных осложнений гемобластозов в Амурской области. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания* 2012; 46:64–68.
2. Клясова Г. А. Антимикробная терапия // В кн.: Савченко В. Г., ред. Программное лечение заболеваний системы крови: сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. — М.: Практика, 2012; с. 827–854.
11. Сидоренко С. В., Страчунский Л. С., Ахмедова Л. И. и др. Результаты многоцентрового исследования сравнительной активности цефепима и других антибиотиков в отношении возбудителей тяжелых госпитальных инфекций (программа «Micromax»). *Антибиотики и химиотерапия* 1999; 44:7–16.
13. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2014; 16:254–265.
14. Клясова Г. А., Сперанская Л. Л., Миронова А. В. и др. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и пробле-

мы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). *Гематология и трансфузиология* 2007; 52:11–18.

16. Эйдельштейн М. В., Страчунский Л. С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2005; 7:323–336.

28. Клясова Г. А., Бриллиантова А. Н., Миронова А. В. Генотипирование грамотрицательных бактерий, выделенных из крови при сепсисе у больных с гематологическими заболеваниями. *Тер архив* 2007; 79:74–80.

41. Охмат В. А., Клясова Г. А., Коробова А. Г. и др. Следует ли назначать карбапенемы всем больным с фебрильной нейтропенией и колонизацией энтеробактериями с продукцией  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра? *Онкогематология* 2016; 11:49–57.

Остальные источники см. в References.

#### References

1. Voytsekhovskiy V. V., Gruzdova A. V., Filatova E. A. et al. The analysis of infectious complications of hemoblastosis in the Amur Region. *Russian Journal of Physiology and Pathology of Respiration (Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya)* 2012; 46:64–68 (in Russian).
2. Klyasova G. A. Antimicrobial therapy // In: Savchenko V. G., ed. Program treatment of blood system diseases. — Moscow: Praktika, 2012; 829–853 (in Russian).
3. Blijlevens N. M., Donnelly J. P., De Pauw B. E. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:1269–78. DOI:10.1038/sj.bmt.1702447
4. Biehler L. M., Schmidt-Hieber M., Liss B. et al. Colonization and infection with extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in high-risk patients — Review of the literature from a clinical perspective. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42:1–16. DOI:10.3109/1040841X.2013.875515
5. Paterson D. L., Bonomo R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:657–686. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
6. Knothe H., Shah P., Krcmery V. et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11:315–317. PMID:6321357
7. Coque T. M., Baquero F., Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13: pii 19051. PMID:19021958
8. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Geneva: WHO; 2014. Доступно по адресу: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf) (по состоянию на 21.11.2017).
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015. Доступно по адресу: <https://ecdc.europa.eu/en/home> (по состоянию на 21.11.2017)
10. Gazouli M., Sidorenko S. V., Tzelepi E. et al. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St. Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:119–121.

11. Sidorenko S. V., Strachunskiy L. S., Akhmedova L. I. et al. The results of a multicenter study of comparative activity of cefepime and other antibiotics against etiological agent of severe nosocomial infection (the program «Micromax»). *Antibiotics and Chemotherapy (Antibiotiki i khimioterapiya)* 1999; 44:7–16 (in Russian).
12. Sukhorukova M., Kozyreva V., Ivanchik N. et al. Five-year trends in the prevalence and types of ESBLs and antimicrobial susceptibility of ESBL-producing nosocomial strains of Enterobacteriaceae in Russia. 20th European congress of clinical microbiology and infectious diseases. Vienna, 2010. Доступно по адресу: [http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)64429-3/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)64429-3/pdf) (по состоянию на 21.11.2017)
13. Sukhorukova M. V., Edelstein M. V., Skleenova E. Yu. et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacteriaceae isolates in Russia: results of national multicenter surveillance study «MARATHON» 2011–2012. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya)* 2014; 4:254–265 (in Russian).
14. Klyasova G. A., Speranskaya L. L., Mironova A. V. et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromised patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)* 2007; 52:11–18 (in Russian).
15. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I. et al. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3724–3732.
16. Edelstein M. V., Strachunskiy L. S. Trends in the prevalence and susceptibility of ESBL-producing Enterobacteriaceae to various antimicrobial agents in Russian ICUs. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya)* 2005; 7:323–336 (in Russian).
17. Rossolini G. M., D'Andrea M. M., Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:33–41.
18. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1–14. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x
19. Averbuch D., Orasch C., Cordonnier C. et al. European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance: summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. *Haematologica* 2013; 98:1826–1835. doi:10.3324/haematol.2013.091025.
20. Guyot K., Biran V., Doit C. et al. Raman spectroscopic analysis of the clonal and horizontal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:2827–2834. doi:10.1007/s10096-012-1636-4.
21. Paniara O., Platsouka E., Dimopoulou H. et al. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother* 2000; 12:204–207. doi:10.1179/joc.2000.12.3.204
22. Ganeswire R., Thong K. L., Puthucherry S. D. Nosocomial outbreak of *Enterobacter gergoviae* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. *J Hospital Infect* 2003; 53:292–296.
23. Adler A., Baraniak A., Izdebski R. et al. A multinational study of colonization with extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthcare personnel and family members of carrier patients hospitalized in rehabilitation centres. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:O516–523. doi:10.1111/1469-0691.12560.
24. Calbo E., Freixas N., Xercavins M. et al. Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and control. *Clin Infect Dis* 2011; 52:743–749. doi:10.1093/cid/ciq238.
25. Hilty M., Betsch B. Y., Bogli-Stuber K. et al. Transmission dynamics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin Infect Dis* 2012; 55:967–975. doi:10.1093/cid/cis581.
26. Tschudin-Sutter S., Frei R., Dangel M. et al. Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae without contact isolation. *Clin Infect Dis* 2012; 55:1505–1511. doi: 10.1093/cid/cis770.
27. Baquero F., Coque T. M., Canton R. Allodemics. *Lancet Infect* 2002; 2:591–592.
28. Klyasova G. A., Brilliantova A. N., Mironova A. V. Genotyping of gram-negative bacteria isolated from blood in sepsis in patients with hematological diseases. *Therapeutic Archive (Terapevticheskiy arkhiv)* 2007; 79:74–80 (in Russian).
29. Cuartero C., Sanchez Diaz A. M., Ruiz-Garbajosa P. et al. Dynamics of intestinal colonization with extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in neutropenic oncohaematological patients. P2132 // In: Bacterial infections in cancer patients. Proceeding of 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013, Apr 27–30. — Berlin: 2013. Доступно по адресу: [https://www.escmid.org/escmid\\_publications/escmid\\_elibrary/?q=Cuartero+C.&id=2173&l=0&x=27&y=18](https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?q=Cuartero+C.&id=2173&l=0&x=27&y=18) (по состоянию на 21.11.2017)
30. Martin R. M., Cao J., Brisse S. et al. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* 2016; 1:pii: e00261–16. doi:10.1128/mSphere.00261-16.
31. Samet A., Sledzinska A., Krawczyk B. et al. Leukemia and risk of recurrent *Escherichia coli* bacteremia: genotyping implicates *E. coli* translocation from the colon to the bloodstream. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32:1393–1400. doi:10.1007/s10096-013-1886-9.
32. Krawczyk B., Sledzinska A., Szemiako K. et al. Characterisation of *Escherichia coli* isolates from the blood of haematological adult patients with bacteraemia: translocation from gut to blood requires the cooperation of multiple virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34:1135–1143. doi:10.1007/s10096-015-2331-z.
33. Platteel T. N., Leverstein-van Hall M. A., Cohen Stuart J. W. et al. Predicting carriage with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria at hospital admission: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21:141–146. doi:10.1016/j.cmi.2014.09.014.
34. Bilavsky E., Temkin E., Lerman Y. et al. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae on admission to rehabilitation centres. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:O804–810. doi:10.1111/1469-0691.12633.
35. Mushtaq A., Carvalho M., Chishti N. et al. Frequency of carriage of New Delhi metallo beta-lactamase-1 (NDM-1) and CTX-M-15 among patients from hospitals in Karachi: preliminary data assessing risk factors for carriage and infection. 23th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. — Berlin, 2013. Доступно по адресу: [https://www.escmid.org/escmid\\_library/online\\_lecture\\_library/material/?mid=6957](https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/material/?mid=6957) (по состоянию на 21.11.2017)
36. Liss B. J., Vehreschild J. J., Cornely O. A. et al. Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant

- enterococci (VRE) and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection* 2012; 40:613–619. doi:10.1007/s15010-012-0269-y.
37. Arnan M., Gudiol C., Calatayud L. et al. Risk factors for, and clinical relevance of, faecal extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) carriage in neutropenic patients with haematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30:355–360. doi:10.1007/s10096-010-1093-x.
38. Cornejo-Juarez P., Suarez-Cuenca J. A., Volkow-Fernandez P. et al. *Escherichia coli* carriage as a risk factor for bacteremia in patients with hematological malignancies. *Support Care Cancer* 2016; 24:253–259. doi:10.1007/s00520-015-2772-z.
39. Calatayud L., Arnan M., Linares J. et al. Prospective study of fecal colonization by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in neutropenic patients with cancer. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4187–4190. doi:10.1128/AAC.00367-08.
40. Ben-Ami R., Schwaber M. J., Navon-Venezia S. et al. Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae into the hospital. *Clinical infectious diseases* 2006; 42:925–934. doi:10.1086/500936.
41. Okhmat V. A., Klyasova G. A., Korobova A. G. et al. Should to all patients with febrile neutropenia and colonization with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae carbapenems be appointed? *Oncohematology (Onkogematologiya)* 2016; 11:49–57 (in Russian). doi:10.17650/1818-8346-2016-11-3-49-57.
42. Bisson G., Fishman N. O., Patel J. B. et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hospital Epidemiol* 2002; 23:254–260. doi:10.1086/502045.
43. Pasricha J., Koessler T., Harbarth S. et al. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae among internal medicine patients in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013; 2:20. doi:10.1186/2047-2994-2-20.
44. Apisarnthanarak A., Bailey T. C., Fraser V. J. Duration of stool colonization in patients infected with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1322–1323. doi:10.1086/533475.
45. Titelman E., Hasan C. M., Iversen A. et al. Faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae is common 12 months after infection and is related to strain factors. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:O508–515. doi:10.1111/1469-0691.12559.
46. Bucaneveva G., Castagnolab E., Viscoli C. et al. Quinolone prophylaxis for bacterial infections in afebrile high risk neutropenic patients. *Eur J Cancer Suppl* 2007; 5:5–12. doi:10.1016/j.ejcsup.2007.06.002.
47. Bow E. J. Fluoroquinolones, antimicrobial resistance and neutropenic cancer patients. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24:545–553. doi:10.1097/QCO.0b013e32834cf054.
48. Tumbarello M., Sanguinetti M., Montuori E. et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1987–1994. doi:10.1128/AAC.01509-06.
49. Paterson D. L., Ko W. C., Von Gottberg A. et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis* 2004; 39:31–37. doi:10.1086/420816.
50. Pea F., Poz D., Viale P. et al. Which reliable pharmacodynamics breakpoint should be advised for ciprofloxacin monotherapy in the hospital setting? A TDM-based retrospective perspective. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:380–386. doi:10.1093/jac/dkl226.

# ГЕМОФИЛИЯ А СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ У ДЕВОЧКИ С НЕСБАЛАНСИРОВАННОЙ ЛАЙОНИЗАЦИЕЙ ХРОМОСОМЫ X

## Skewed X-chromosome inactivation in heterozygous female with moderate hemophilia A

Бескоровайная Т. С.<sup>1</sup>, Аbruкова А. В.<sup>2</sup>, Миронович О. Л.<sup>1</sup>, Блинец Е. А.<sup>1</sup>, Миловидова Т. Б.<sup>1</sup>, Щагина О. А.<sup>1</sup>, Саваскина Е. Н.<sup>2</sup>, Поляков А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

<sup>2</sup> БУ Чувашской Республики «Президентский перинатальный центр» Минздрава Чувашской Республики, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Россия

Beskorovainaya T. S.<sup>1</sup>, Abrukova A. V.<sup>2</sup>, Mironovich O. L.<sup>1</sup>, Bliznets E. A.<sup>1</sup>, Milovidova T. B.<sup>1</sup>, Shchagina O. A.<sup>1</sup>, Savaskina E. N.<sup>2</sup>, Polyakov A. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Presidential perinatal centre, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

### РЕЗЮМЕ

Представлены результаты молекулярно-генетического обследования девочки с клиническими признаками гемофилии А средней тяжести — это первое в России описание молекулярных причин гемофилии у пациентки женского пола. Пробанд является дочерью больного гемофилией А тяжелой степени, у которого обнаружена частая мутация гена *F8* — инверсия интрона 22 (Inv22). У пациентки была выявлена мутация Inv22, унаследованная от отца. Также у нее обнаружены три доброкачественных варианта гена *F8* в гетерозиготном состоянии: с. 1010-27G>A, с. 3780C>G (р. D1260E), с. 3864A>C (р. S1288=). В образцах геномной ДНК, полученных из крови и буккального эпителия пациентки, выявлена экстремально смещенная лайонизация хромосом X — 95:5% и 85:15% соответственно. В работе показано, что наблюдаемый смещенный паттерн лайонизации характеризуется преобладанием клонов клеток с неактивной материнской хромосомой X и транскрипционно активной отцовской хромосомой, несущей дефектный ген *F8*. Редко встречающееся сочетание гетерозиготного носительства мутации в гене *F8* с экстремально смещенной лайонизацией хромосомы X обусловило развитие у девочки клиники гемофилии А.

**Ключевые слова:** гемофилия; *F8*; инверсия интрона 22; лайонизация хромосомы X

### ABSTRACT

This molecular genetic study of a girl with moderate hemophilia A is the first Russian report describing the cause of hemophilia in a female patient. The proband's father suffers from severe hemophilia A and has a common *F8* gene mutation, specifically an inversion of intron 22 (Inv22). Along with the Inv22 mutation inherited from her father, the girl was also found to be heterozygous for three benign mutations in the *F8* gene: c.1010-27G>A, c.3780C>G (p.D1260E), and c.3864A>C (p.S1288=). A dramatically skewed X-chromosome inactivation was detected in the proband's blood and buccal epithelium samples (95:5% and 85:15% respectively). The maternal X-chromosome was selectively inactivated. The paternal X-chromosome with the mutant *F8* gene remained active, and thus caused hemophilia A in a heterozygous female.

**Keywords:** haemophilia; *F8* gene; intron 22 inversion; skewed X-inactivation

**For citation:** Beskorovainaya T. S., Abrukova A. V., Mironovich O. L., Bliznets E. A., Milovidova T. B., Shchagina O. A., Savaskina E. N., Polyakov A. V. Skewed X-chromosome inactivation in heterozygous female with moderate hemophilia A. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (*Gematologiya i transfuziologiya*). 2018; 63(1):184–190 (in Russian) doi: 10.25837/HAT.2018.79..2..009

**For correspondence:** Beskorovainaya Tatiana S., MD, PhD, researcher, DNA diagnostics laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478, Russian Federation  
E-mail: t-kovalevskaya@yandex.ru

**Для цитирования:** Бескоровайная Т. С., Аbruкова А. В., Миронович О. Л., Блинец Е. А., Миловидова Т. Б., Шагина О. А., Саваскина Е. Н., Поляков А. В. Гемофилия А средней тяжести у девочки с несбалансированной лайонизацией хромосомы X. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(1):184–190  
doi: 10.25837/HAT.2018.79..2..009

**Для корреспонденции:** Бескоровайная Татьяна Сергеевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия

Электронная почта: t-kovalevskaya@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.12.17

Принята к печати 16.05.18

#### Information about authors:

Beskorovainaya T. S., <https://orcid.org/0000-0001-5656-2561>;

Abrukova A. V., <https://orcid.org/0000-0002-2225-2773>;

Mironovich O. L., <https://orcid.org/0000-0003-0351-1271>;

Bliznets E. A., <https://orcid.org/0000-0002-5339-5566>;

Milovidova T. B., <https://orcid.org/0000-0002-0050-6947>;

Shchagina O. A., <https://orcid.org/0000-0003-4905-1303>;

Savaskina E. N., <https://orcid.org/0000-0002-1176-8993>;

Polyakov A. V., <https://orcid.org/0000-0002-0105-1833>.

**Financial disclosure.** The study had no sponsorship.

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

Received 13 Dec 2017

Accepted 16 May 2018

## Введение

Гемофилия А — это самая частая наследственная патология среди нарушений свертывания крови. Заболевание наследуется по X-сцепленному рецессивному типу, встречается с частотой 1:5000 новорожденных мальчиков [1, 2]. Данная форма гемофилии обусловлена мутациями гена *F8*, которые в различной степени влияют на синтез, строение и функционирование фактора свертывания VIII (FVIII). В зависимости от активности фактора выделяют несколько степеней тяжести заболевания: менее 1% — тяжелая, 1–5% — средней тяжести, 5–40% — легкая [3]. Самая частая мутация в гене *F8* — это инверсия интрона 22 (Inv22), которая является причиной 40–50% случаев тяжелой формы гемофилии А [4, 5]. Женщины, являющиеся гетерозиготными носительницами мутации гена *F8*, — матери больных мальчиков, их сестры, дочери больных отцов — обычно не имеют клинических проявлений заболевания, уровень активности FVIII в их плазме составляет не менее 50%.

Крайне редко гемофилия, как и другие X-сцепленные рецессивные заболевания, проявляется и у женщин, что обусловлено одной из следующих причин:

- наличием мутаций в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии [6, 7];
- наличием мутации в гемизиготном состоянии при синдроме Шерешевского—Тернера [8];

*или*

- наличием двух мутантных аллелей, унаследованных от одного родителя в случае однородительской дисомии [9];
- у гетерозиготных носительниц патогенного варианта симптомы заболевания могут проявляться при неравной лайонизации хромосом X [10].

В 50% случаев причиной дефицита активности FVIII у пациенток с гемофилией А является гетерозиготное носительство патогенной мутации гена *F8* в сочетании

со смещенной (несбалансированной) лайонизацией хромосомы X [11]. Лайонизация хромосомы X — это процесс инактивации одной из хромосом X у плода женского пола млекопитающих в раннем эмбриогенезе, в результате которого утрачивается транскрипционная активность одной из двух хромосом для дозовой компенсации экспрессии X-сцепленных генов [12]. В каждой клетке этот процесс независим, и выбор, какая из двух хромосом X будет инактивироваться, происходит случайным образом. В итоге женский организм становится мозаичным: в половине клеток неактивна хромосома X отцовского происхождения, в другой половине — материнского. Соотношение указанных клонов клеток обычно близко к 1:1, что является численным показателем лайонизации хромосомы X [13]. Иногда вследствие ряда причин наблюдается несбалансированная лайонизация в сторону одной из клеточных линий. Смещенным считается соотношение клонов более 75:25% и экстремально смещенным — соотношение более 95:5% [13]. Несбалансированный паттерн инактивации хромосомы X в отдельных тканях выявляется у 14% здоровых новорожденных девочек, а также возникает с возрастом и к шестидесяти годам наблюдается у почти половины женщин без клинических проявлений [14]. Однако сочетание такого смещенного паттерна лайонизации с носительством на транскрибируемой хромосоме X патогенного варианта приводит к развитию X-сцепленного рецессивного заболевания.

Оценить вклад остальных этиологических факторов в патогенез гемофилии А у женщин весьма сложно, так как X-сцепленные рецессивные заболевания проявляются у них крайне редко. Поэтому консультирование таких пациенток затруднительно из-за недостаточности систематизированных данных о течении заболевания, его осложнениях, генетических факто-

рах и методах лечения женщин с тяжелой и средне-тяжелой формой гемофилии. В статье представлено первое в России описание молекулярно-генетического исследования девочки с гемофилией А средней степени тяжести.

## Материалы и методы

В данной работе проведено генетическое обследование девочки, облигатной носительницы гемофилии А. Пациентка имеет клинические проявления гемофилии средней степени тяжести. От родителей девочки было получено информированное согласие на проведение исследования.

Показатели коагулограммы пациентки и ее родителей: протромбиновый индекс (ПТИ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), международное нормализованное отношение (МНО), агрегация тромбоцитов, концентрация фибриногена и D-димеров, активность FVIII, FIX, vWF, антитромбина III, протеина С определяли на автоматическом анализаторе STA Compact («F. Hoffman-la-Roche Ltd.», Швейцария).

Цитогенетическое исследование проводили методом G-дифференциального окрашивания метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови.

Выделение ДНК из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА, проводили с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit («Promega», США) согласно протоколу производителя.

Поиск инверсии интрона 22 гена *F8* проводили с помощью медицинской технологии: «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*», являющейся модификацией метода IS-PCR (Inverse Shifting-PCR), предложенного L. Rossetti [15, 16].

Секвенирование по Сенгеру ПЦП-продуктов, полученных с праймеров, комплементарных последовательности гена *F8*, фланкирующих экзоны 1–26, проводили на приборе для капиллярного электрофореза 3130 ABI genetic analyzer («Applied Biosystems», США). Показатели частоты минорного аллеля полиморфных вариантов гена *F8* были взяты из баз данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) и Genome Aggregation Database (<http://gnomad.broadinstitute.org>).

Анализ гена *vWF* проведен на секвенаторе нового поколения Ion S5. Для пробоподготовки использована технология ультрамультиплексной ПЦП, сопряженная с последующим секвенированием (AmpliSeq™). Анализ проведен с использованием кастомной панели Coagulum, включающей кодирующие последовательности генов: *FVII*, *FIX*, *vWF*. По данным AmpliSeq™ Coverage Analysis, расчетное покрытие панели составляет 95,7%. Обработка результатов секвенирования проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого ThermoFisher Scientific (Torrent Suite™), а также программного обеспечения Gene-Talk. Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы базы данных dbSNP и Genome Aggregation Database. Патогенность вариантов оценивали согласно руководству по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования [17].

Для исследования паттерна лайонизации проводили анализ, предложенный Allen et al. [18], заключающийся в определении паттерна метилирования X-сцепленного полиморфного повтора HUMARA — (CAG)<sub>n</sub> в экзоне 1 гена *AR* — методом метилчувствительной количественной флуоресцентной ПЦП (QF-PCR) с последующим фрагментарным анализом на генетическом анализаторе 3130 ABI genetic analyzer («Applied Biosystems», США). Далее определяли процентное соотношение количества клеток, несущих инактивированную хромосому материнского либо отцовского происхождения (XCI ratio) по формуле, предложенной Bolduc et al [14].

Для исследования паттерна лайонизации проводили анализ, предложенный Allen et al. [18], заключающийся в определении паттерна метилирования X-сцепленного полиморфного повтора HUMARA — (CAG)<sub>n</sub> в экзоне 1 гена *AR* — методом метилчувствительной количественной флуоресцентной ПЦП (QF-PCR) с последующим фрагментарным анализом на генетическом анализаторе 3130 ABI genetic analyzer («Applied Biosystems», США). Далее определяли процентное соотношение количества клеток, несущих инактивированную хромосому материнского либо отцовского происхождения (XCI ratio) по формуле, предложенной Bolduc et al [14].

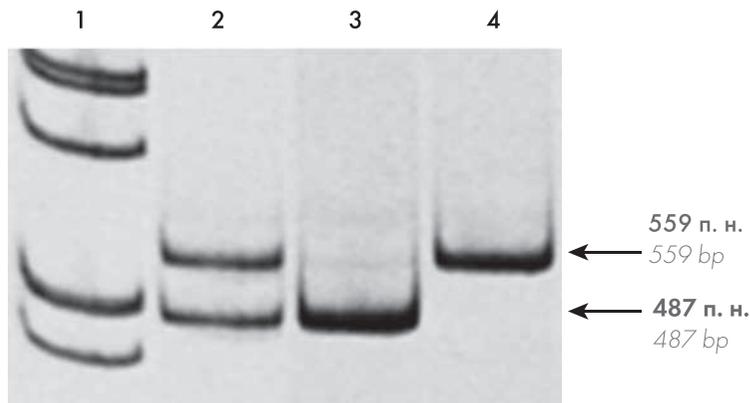
## Результаты

Приводим описание клинического наблюдения случая гемофилии А средней тяжести у девочки с несбалансированной лайонизацией хромосомы X.

Пациентка — девочка, 9 лет, от 1-й беременности (угроза прерывания, многоводие). Роды срочные в 38–39 нед, оперативные (первичная слабость родовой деятельности). Масса тела при рождении составила 3378 г, рост 52 см. Оценка по шкале Апгар 8–9 баллов. В раннем неонатальном периоде была конъюгационная желтуха. Выписана домой в удовлетворительном состоянии. Росла и развивалась соответственно возрасту.

Манифестация заболевания произошла в 2 года 11 мес в виде дважды возникших в результате прикусывания длительных кровотечений из слизистой языка. При изучении анамнеза установлено, что с началом самостоятельной ходьбы отмечались частые синяки. Была госпитализирована в гематологическое отделение для уточнения диагноза. При поступлении общее состояние было средней тяжести, обусловлено геморрагическим синдромом. Пациентка правильного телосложения, умеренного питания, кожа бледная, в области верхних и нижних конечностей, на теле и в правой паховой области имелись множественные экхимозы, на языке — единичная петехиальная сыпь. Костно-суставная система без видимой патологии. Периферические лимфатические узлы не пальпировались. В легких выслушивалось пуэрильное дыхание, хрипов не было, ЧД 25 мин<sup>-1</sup>, тоны сердца ясные ритмичные, ЧСС 102 мин<sup>-1</sup>.

Данные общего анализа крови: гемоглобин 147 г/л, эритроциты  $4,46 \times 10^{12}/л$ , лейкоциты  $6,2 \times$



**Рисунок 1.** Электрофореграмма результатов детекции инверсии интрона 22 гена *F8* у пробанда, ее матери и отца. Фрагмент 478 п. н. соответствует нормальному строению гена *F8*, фрагмент 559 п. н. — инверсии интрона 22 гена *F8*. Дорожка 1 — маркер молекулярных весов  $\lambda$ /*Pst*I; дорожка 2 — пробанд: *Inv22* в гетерозиготном состоянии; дорожка 3 — мать пробанда: норма; дорожка 4 — отец пробанда: *Inv22* в гемизиготном состоянии.

**Figure 1.** The electrophoretogram with the results of the *F8* gene intron 22 inversion detection in proband, her mother and father. The fragment of 478 bp corresponds to the normal *F8* gene, the fragment of 559 bp — to the *F8* gene intron 22 inversion. Line 1 — molecular weight marker  $\lambda$ /*Pst*I; line 2 — proband: *Inv22* in heterozygous state; line 3 — proband's mother: normal; line 4 — proband's father: *Inv22* in hemizygous state.

$10^9$ /л, тромбоциты  $180 \times 10^9$ /л, цветной показатель 0,95; СОЭ 2 мм/ч.

Коагулограмма: ПТИ 80%, АЧТВ 78 с, фибриноген 2,6 г/л, РФМК 14 мг/100 мл, антитромбин III 88%, МНО 1,32, протеин С 58%, D-димеры 0,25 мкг/мл, FVIII 3,64% (в контроле через 1 день 4,53%), FIX 68,6%, vWF 59%. Агрегация тромбоцитов (лазерный анализатор Биола LA 230-2) — спонтанная, с ристомидином, коллагеном, АДФ 5 мкМ, адреналином — нарушений не выявлено.

В последующем анализе: активность FVIII 0,8%, после введения концентрата FVIII 18%; активность FIX 88%, после введения концентрата FVIII 168%; активность vWF 100%, после введения концентрата FVIII 159%. В настоящее время больная получает заместительную терапию концентратом FVIII; ее регулярно наблюдает гематолог.

Наследственность пациентки отягощена — отец болен гемофилией А тяжелой степени (имеет выраженные клинические проявления, активность FVIII < 1%). Мать клинически здорова, в коагулограмме: АЧТВ 25,9 с, ПВ 10,7 с, ТВ 14,7 с, фибриноген 3 г/л, РФМК 8 мг/100 мл, МНО 0,95, активность FVIII 70,6%, активность FIX 196%, активность vWF 41%. Агрегация тромбоцитов (лазерный анализатор Биола LA 230-2) — спонтанная, с ристомидином, коллагеном, АДФ 5 мкМ, адреналином — нарушений не выявлено.

Молекулярно-генетическое обследование больной девочки проводили с целью установления причины

проявления клинических признаков гемофилии А и прогноза для будущего потомства матери пациентки.

## Обсуждение

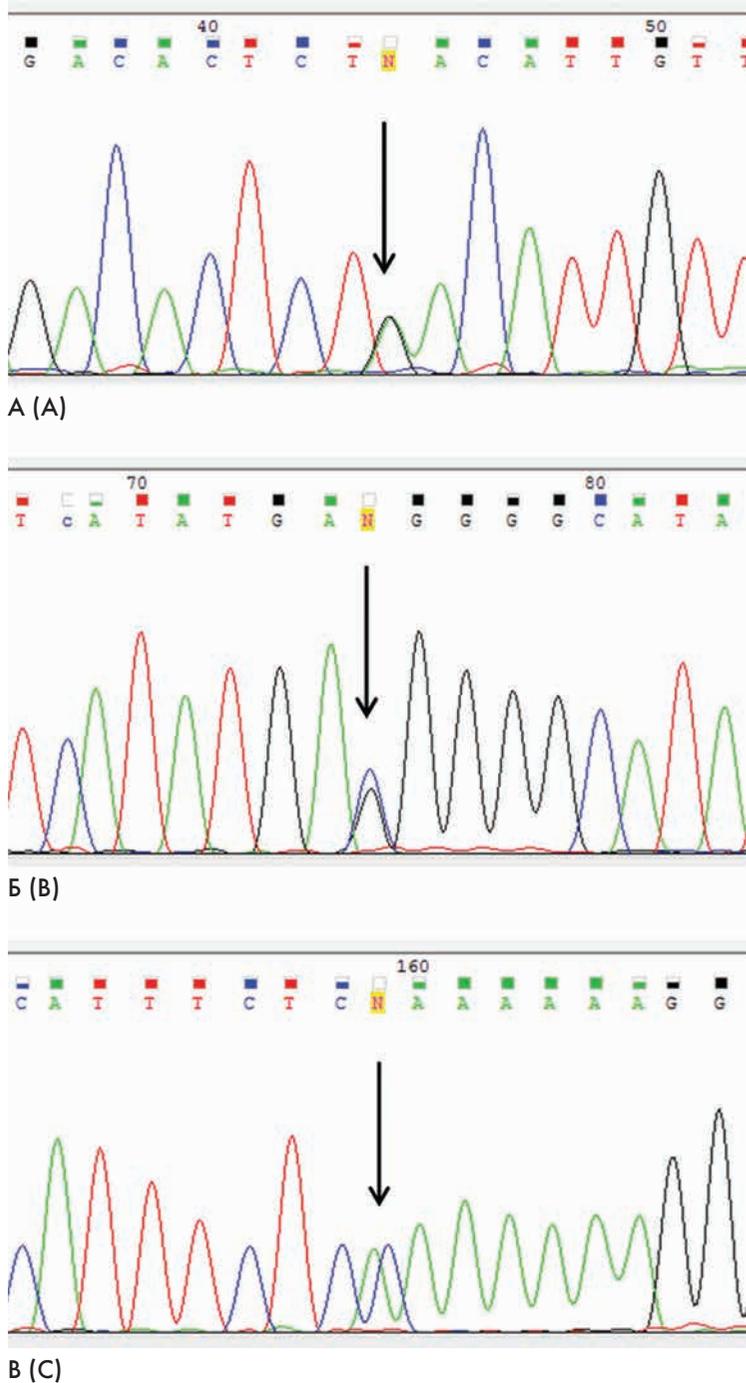
При цитогенетическом исследовании установлено, что кариотип обследуемой соответствовал нормальному женскому — 46, XX. Ни численных, ни структурных хромосомных аномалий не обнаружено. Методом ПЦР у девочки была выявлена унаследованная от отца инверсия интрона 22 в гетерозиготном состоянии (рис. 1). Обнаружение гетерозиготного носительства инверсии позволило исключить наличие однородительской дисомии по хромосоме X. При нормальном кариотипе возникновение клинических проявлений у пациентки женского пола возможно при наличии либо второй мутации гена *F8*, возникшей *de novo* или унаследованной от матери, либо смещенной инактивации X-хромосомы.

Для поиска других мутаций гена *F8* методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру у пациентки проведен анализ нуклеотидной последовательности всех 26 экзонов гена. Выявлены три доброкачественных варианта в гетерозиготном состоянии: с. 1010-27G>A (rs7058826), с. 3780C>G (p. D1260E) (rs1800291) и с. 3864A>C (p. S1288=) (rs1800292) (рис. 2), встречающиеся среди здорового населения с частотой минорного аллеля 12,2, 19,3 и 13,9% соответственно. Аллели с. 1010-27A и с. 3780G унаследованы девочкой от матери. Ранее показано, что у мужчин доброкачественный вариант с. 3780G приводит к снижению активности FVIII на 6—11% [19, 20]. Незначительное влияние этого аллеля на концентрацию FVIII также было подтверждено с помощью функционального анализа [21]. Однако присутствие в гене *F8* только данной нуклеотидной замены у пробандов мужского пола не приводило к развитию гемофилии А. Таким образом, значительное снижение концентрации FVIII у анализируемой в настоящей работе девочки не может объясняться наличием в гене *F8* инверсии интрона 22 на одной X-хромосоме и доброкачественных вариантов с. 1010-27A и с. 3780G на второй хромосоме.

Так как у матери пробанда было выявлено снижение активности vWF (41%) и при первом обращении у ребенка активность этого фактора составляла 59%, необходимо также было исключить у больной девочки сочетание двух наследственных коагулопатий. Для этого у родителей девочки провели поиск мутаций гена *vWF* методом массового параллельного секвенирования. Патогенных и вероятно патогенных вариантов не обнаружено.

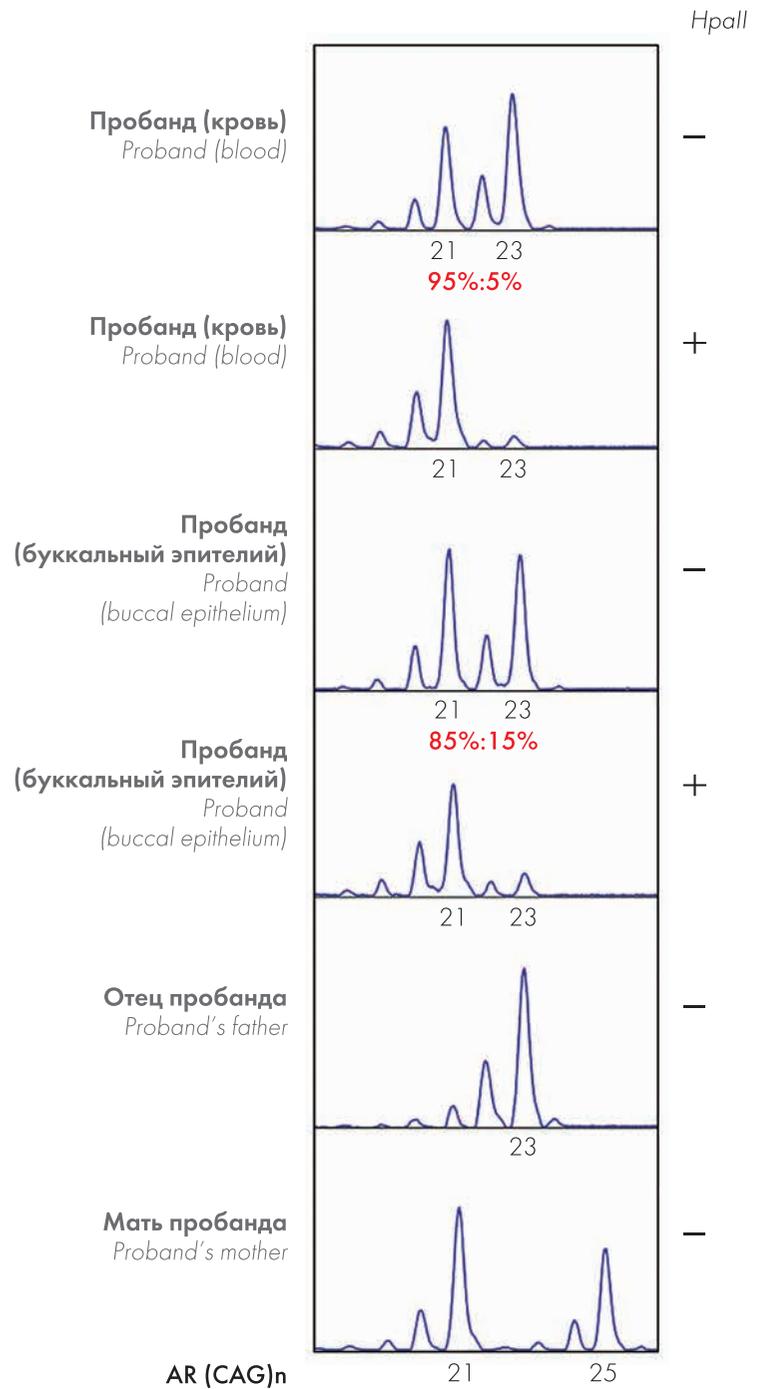
Для определения паттерна лайонизации хромосом X в геномной ДНК методом метилчувствительной QF-PCR у пациентки, ее матери и отца было проведено определение метилирования высокополиморфного повтора (CAG)<sub>n</sub> в экзоне 1 гена андрогенового рецептора *AR* (рис. 3). Рядом с этим повтором находятся два сайта узнавания для метилчувствительного фермента

рестрикции *HpaII*, который может расщеплять нуклеотидную последовательность неметилированной, то есть активной X-хромосомы. Таким образом, после обработки ферментом ПЦР-продукт экзона 1 гена *AR* возможно получить только с инактивированной X-хромосомы.



**Рисунок 2.** Фрагменты электрофореграмм экзонов 8 и 14 гена *F8* пробанда, содержащие доброкачественные варианты с. 1010-27G>A (А), с. 3780C>G (р. D1260E) (Б) и с. 3864A>C (р. S1288=) (В) в гетерозиготном состоянии.  
**Figure 2.** Proband's *F8* gene exons 8 and 14 electrophoregrams that contain the benign variants c. 1010-27G>A (A), c. 3780C>G (p. D1260E) (B) and c. 3864A>C (p.S1288=) (C) in a heterozygous state.

У пациентки в лейкоцитах периферической крови, а также в клетках буккального эпителия наблюдалась экстремально смещенная лайонизация хромосом X — 95:5% и 85:15% соответственно. Согласно полученным результатам, наблюдаемый паттерн лайонизации характеризуется преобладанием клонов клеток с неактив-



**Рисунок 3.** Аллели и паттерн метилирования X-сцепленного полиморфного повтора HUMARA — (CAG)*n* в экзоне 1 гена *AR* до и после обработки метилчувствительным ферментом рестрикции *HpaII* у пробанда, матери и отца пробанда.  
**Figure 3.** Alleles and methylation pattern of X-linked polymorphic repeat HUMARA — (CAG)*n* in exon 1 of *AR* gene before and after processing with methyl-sensitive restriction enzyme *HpaII* in proband, her mother and father.

ной материнской хромосомой X (аллель 21 на рис. 3) и транскрипционно активной отцовской хромосомой, несущей дефектный ген *F8* (аллель 23 на рис. 3).

В литературе описаны три основных вероятных механизма, приводящих к смещению паттерна лайонизации. Первый механизм — это влияние в раннем эмбриогенезе, на стадии 8–16-клеточной бластоцисты, стохастических факторов на выбор того, какая из хромосом X инактивируется в конкретной клетке. Во-вторых, выбор, какая из хромосом X инактивируется, может зависеть от наличия дополнительной мутации в генах, регулирующих процесс лайонизации. Так, ранее были описаны семьи со сдвигом инактивации у женщин из нескольких поколений. У некоторых из них были найдены мутации в промоторной области гена *XIST*, кодирующего нетранслируемую РНК, участвующую в формировании гетерохроматина на цис-хромосоме X [22, 23]. Третий механизм заключается в сдвиге исходно равной лайонизации в течение следующих стадий эмбриогенеза или постнатально в результате отрицательного отбора клеток, несущих дополнительную мутацию гена на хромосоме X, значительно снижающую жизнеспособность клетки [24, 25].

Мутации, приводящие к нарушению процесса метилирования, могут находиться в генах как в цис-, так и в транс-положении, как на X-хромосоме, так и на аутосомах. К сожалению, далеко не все механизмы этого явления до конца ясны и не все гены, ответственные за него, известны.

Таким образом, описан клинический случай гемофилии А у девочки, обусловленный унаследованной от отца мутацией *InV22* гена *F8* и несбалансированной лайонизацией с преобладанием клона клеток с активной хромосомой X, несущей инверсию. Три доброкачественных варианта в гене *F8*, также выявленные у пациентки, не играют роли в проявлении клинической картины заболевания. Дать прогноз для будущего потомства матери пациентки весьма затруднительно, так как точная причина смещенного паттерна лайонизации X-хромосомы неизвестна. На сегодняшний день только рождение ребенка мужского пола может гарантировать данной семье здоровое потомство без гемофилии А. Для прогноза развития гемофилии у девочек в подобных семьях нужны дополнительные исследования механизмов возникновения смещенной лайонизации хромосомы X.

#### Информация об авторах

**Бескоровайная Татьяна Сергеевна** (Beskorovainaya T. S.), кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, t-kovalevskaya@yandex.ru

**Абрукова Анна Викторовна** (Abrukova A. V.), кандидат медицинских наук, врач-генетик высшей категории, Бюджетное учреждение Чувашской Республики «Президентский перинатальный центр» Министер-

ства здравоохранения Чувашской Республики, 428018, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Россия, metra2009@yandex.ru

**Миронович Ольга Леонидовна** (Mironovich O. L.), научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, mironovich\_333@mail.ru

**Близнец Елена Александровна** (Bliznets E. A.), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, bliznetzelena@mail.ru

**Миловидова Татьяна Борисовна** (Milovidova T. B.), кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, tatiana\_milovidova@mail.ru

**Щагина Ольга Анатольевна** (Shchagina O. A.), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, schagina@dnalab.ru

**Саваскина Екатерина Николаевна** (Savaskina E. N.), врач-генетик высшей категории, Бюджетное учреждение Чувашской Республики «Президентский перинатальный центр» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, 428018, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Россия, metra2009@yandex.ru

**Поляков Александр Владимирович** (Polyakov A. V.), доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, polyakov@med-gen.ru

#### Литература

3. Европейский Консорциум гемофилии. Доступно в интернете по адресу: <http://www.ehc.eu/ru/геморрагические-заболевания/гемофилия/>
16. Бескоровайная Т. С., Миловидова Т. Б., Щагина О. А., Поляков А. В. ДНК-диагностика гемофилии А с использованием новой медицинской технологии «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*» в группе больных из Российской Федерации. Медицинская генетика 2016; 15:23–29.
17. Рыжкова О. П., Кардымон О. Л., Прохорчук Е. Б. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). Медицинская генетика 2017; 16:4–17.

Остальные источники см. в References.

#### References

1. Antonarakis S. E., Kazazian H. H., Tuddenham E. G. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. Hum Mutat 1995; 5:1–22.
2. Mannucci P. M., Tuddenham E. G. The hemophilias — from royal genes to gene therapy. N Engl J Med 2001; 344:1773–1779. Review. Erratum in: N Engl J Med 2001; 345:384.
3. European Haemophilia Consortium. Available at: <http://www.ehc.eu/bleeding-disorders/haemophilia/> (in Russian).
4. Lakich D., Kazazian H. H. Jr, Antonarakis S. E. et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe haemophilia A. Nat Genet 1993; 5:236–241.

5. Naylor J., Brinke A., Hassock S. et al. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1773–1778.
6. David D., Morais S., Ventura C. et al. Female haemophilic homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia* 2003; 9:125–130.
7. Cai X. H., Wang X. F., Dai J. et al. Female hemophilia A heterozygous for a de novo frameshift and a novel missense mutation of factor VIII. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1969–1974.
8. Williams V. K., Suppiah R., Coppin B. et al. Investigation of inflicted injury in a young girl reveals mild haemophilia A and Turner's syndrome. *Int J Lab Hematol* 2012; 34:98–101.
9. Quan F., Janas J., Toth-Fejel S. et al. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with duchen muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997; 60:160–165.
10. Renault N. K., Dyack S., Dobson M. J. et al. Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:628–637.
11. Di Michele D. M., Gibb C., Lefkowitz J. M. et al. Severe and moderate haemophilia A and B in US females. *Haemophilia* 2014; 20:e136–143.
12. Lyon M. F., Rastan S. Parental source of chromosome imprinting and its relevance for X chromosome inactivation. *Differentiation* 1984; 26:63–67.
13. Minks J., Robinson W. P., Brown C. J. A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 2008; 118:20–23.
14. Bolduc V., Chagnon P., Provost S. et al. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J Clin Invest* 2008; 118:333–341.
15. Rossetti L. C., Radic C. P., Larripa I. B. et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51:1154–1158.
16. Beskorovainaya T. S., Milovidova T. B., Shchagina O. A., Polyakov A. V. DNA diagnostics in Russian hemophilia patients with new medical technology «Detection system for F8 intron 22 inversion». *Russian Journal of Medical Genetics (Meditsinskaya genetika)* 2016; 15:23–29 (in Russian).
17. Ryzhkova O. P., Kardymon O. L., Prokhorchuk E. B. et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants. *Russian Journal of Medical Genetics (Meditsinskaya genetika)* 2017; 16:4–17 (in Russian).
18. Allen R. C., Zoghbi H. Y., Moseley A. B. et al. Methylation of Hpa II and Hha I sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51:1229–1239.
19. Scanavini D., Legnani C., Lunghi B. et al. The factor VIII D1241E polymorphism is associated with decreased factor VIII activity and not with activated protein C resistance levels. *Thromb Haemost* 2005; 93:453–456.
20. Nossent A. Y., Eikenboom J. C., Vos H. L. et al. Haplotypes encoding the factor VIII 1241 Glu variation, factor VIII levels and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2006; 95:942–948.
21. Pahl S., Pavlova A., Driesen J. et al. Effect of F8 B domain gene variants on synthesis, secretion, activity and stability of factor VIII protein. *Thromb Haemost* 2014; 111:58–66.
22. Plenge R. M., Hendrich B. D., Schwartz C. et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet* 1997; 17:353–356.
23. Pugacheva E. M., Tiwari V. K., Abdullaev Z. et al. Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 2005; 14:953–965.
24. Plenge R. M., Stevenson R. A., Lubs H. A. et al. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet* 2002; 71:168–173.
25. Clerc P., Avner P. Random X-chromosome inactivation: skewing lesson for mice and men. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16:246–253.

# ВРОЖДЕННАЯ ФОРМА ТРОМБОТИЧЕСКОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРЫ. КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ

## Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. Case report and review

Накастоев И. М.<sup>1</sup>, Авдонин П. П.<sup>2</sup>, Грибанова Е. О.<sup>1</sup>, Калинин Н. Н.<sup>3</sup>, Цветаева Н. В.<sup>1</sup>, Петрова В. И.<sup>1</sup>, Калинина И. И.<sup>4</sup>, Канаева М. Л.<sup>1</sup>, Журавлев В. В.<sup>1</sup>, Бiryukova Л. С.<sup>1</sup>, Авдонин П. В.<sup>2</sup>, Рыжко В. В.<sup>1</sup>

Nakastoev I. M.<sup>1</sup>, Avdonin P. P.<sup>2</sup>, Gribanova E. O.<sup>1</sup>, Kalinin N. N.<sup>3</sup>, Tsvetaeva N. V.<sup>1</sup>, Petrova V. I.<sup>1</sup>, Kalinina I. I.<sup>4</sup>, Kanaeva M. L.<sup>1</sup>, Zhuravlev V. V.<sup>1</sup>, Biryukova L. S.<sup>1</sup>, Avdonin P. V.<sup>2</sup>, Ryzhko V. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва

<sup>1</sup> National Research Center for Hematology, Moscow

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва

<sup>2</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>3</sup> МНОЦ МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup> Medical Research and Educational Center of the Lomonosov Moscow State University, Moscow

<sup>4</sup> Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва

<sup>4</sup> Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

### РЕЗЮМЕ

**Резюме.** Представлен клинический случай десятилетнего наблюдения пациента с тяжелой формой врожденной тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), которому проводилась постоянная заместительная терапия переливаниями свежезамороженной плазмы (СЗП). При первом обследовании активность ADAMTS-13 в плазме крови пациента не выявлялась, содержание мультимеров фактора фон Виллебранда было повышено. В процессе лечения течение заболевания периодически осложнялось острой почечной недостаточностью и печеночной дисфункцией. Все осложнения возникали при удлинении интервалов между процедурами плазмафереза и носили частично обратимый характер. На том основании, что при обследовании не был обнаружен ингибитор ADAMTS-13, а симптомы заболевания появились в раннем детстве (петехии на коже при инфекциях), была установлена врожденная форма ТТП. После уточнения формы заболевания процедуры плазмафереза были заменены на плановое переливание СЗП. Оценивая динамику снижения числа тромбоцитов, определяли необходимые интервалы между трансфузиями. Исследовали динамику снижения активности ADAMTS-13 после трансфузии СЗП. В результате лечения на протяжении последних 6 лет тяжелых осложнений заболевания не было, пациент ведет активный образ жизни, учится и работает.

### ABSTRACT

**Summary.** We present a ten-year follow-up of a patient with severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), who received permanent replacement therapy with freshly frozen plasma (FFP) transfusions. At presentation, the patient had no activity of plasma ADAMTS-13 and an increased concentration of von Willebrand factor multimers. During treatment, the disease was complicated by occasional acute renal failure and hepatic dysfunction. These complications developed when the intervals between plasmapheresis were extended, and were partially reversible. Given the absence of ADAMTS-13 inhibitor and the early childhood history of the signs of the disease (petechiae during infections), the patient was diagnosed with congenital TTP. After the nature of the disease was thus established, plasmapheresis was replaced with regular transfusions of FFP. The intervals between transfusions were determined by monitoring the falling platelet counts and ADAMTS-13 activity. As a result of the treatment over the past 6 years, there have been no serious complications, and the patient leads an active lifestyle, studies and works. Over the course of the treatment, the patient received over 150 transfusions of FFP (amounting to over 100 liters of FFP), but despite the numerous transfusions, the patient has not contracted viral hepatitis or HIV.

За время наблюдения больному проведено более 150 трансфузий СЗП, перелито более 100 л СЗП. Несмотря на большой объем трансфузий донорской плазмы от многих доноров, у пациента не выявляются маркеры вирусного гепатита и ВИЧ.

Таким образом, индивидуально спланированная заместительная терапия переливаниями СЗП больному с врожденной формой ТТП позволила избежать развития тяжелых осложнений, приводящих пациентов к инвалидности. При этом использование карантинизированной или вирусинактивированной СЗП значительно снижает риск инфицирования.

**Ключевые слова:** тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, плазмаферез, свежзамороженная плазма, ADAMTS-13, фактор фон Виллебранда, синдром Апшо—Шульмана

**Для цитирования:** Накастоев И. М., Авдонин П. П., Грибанова Е. О., Калинин Н. Н., Цветаева Н. В., Петрова В. И., Калинина И. И., Канаева М. Л., Журавлев В. В., Бирюкова Л. С., Авдонин П. В., Рыжко В. В. Врожденная форма тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Краткий обзор и описание клинического случая. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):191—199  
doi: 10.25837/HAT.2018.39..2..010

**Для корреспонденции:** Накастоев Ислам Мухарбекович, к. м. н., врач-гематолог, научный сотрудник отделения химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. E-mail: slep06@gmail.com

**Финансирование.** Биохимическая часть представленных в данной работе исследований выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-01267.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.05.2018

Принята к печати 15.10.2018

Thus, a tailored replacement therapy with FFP administered to a patient with congenital TTP helped to avoid severe debilitating complications, while the use of quarantine or virus-inactivated FFP minimized the risk of transfusion-related infections.

**Key words:** thrombotic thrombocytopenic purpura, plasmapheresis, freshly frozen plasma, ADAMTS-13, von Willebrand factor, Upshaw—Schulman syndrome

**For citation:** Nakastoev I. M., Avdonin P. P., Griбанова E. O., Kalinin N. N., Tsvetaeva N. V., Kalinina I. I., Kanaeva M. L., Zhuravlev V. V., Biryukova L. S., Avdonin P. V., Ryzhko V. V. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. Case report and review. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):191—199 (in Russian)  
doi: 10.25837/HAT.2018.39..2..010

**For correspondence:** Nakastoev Islam Mukharbekovich, PhD, hematologist, research scientist, department of hematological diseases' chemotherapy, National Research Center for Hematology, Russia, Moscow. E-mail: slep06@gmail.com

**Information about authors:**

Nakastoev I. M. <https://orcid.org/0000-0002-8712-9813>;

Avdonin P. P. <https://orcid.org/0000-0002-4138-1589>;

Griбанова E. O. <https://orcid.org/0000-0002-4155-7820>;

Kalinin N. N. Scopus Author ID: 57194416165;

Tsvetaeva N. V. <https://orcid.org/0000-0002-0977-215X>;

Kalinina I. I. Scopus Author ID: 36496920100;

Kanaeva M. L. <https://orcid.org/0000-0001-6840-6152>;

Zhuravlev V. V. <https://orcid.org/0000-0003-3034-4843>;

Biryukova L. S. <https://orcid.org/0000-0003-1098-8406>;

Avdonin P. V. <https://orcid.org/0000-0002-4138-1589>;

Ryzhko V. V. <https://orcid.org/0000-0003-1221-3495>.

**Financial disclosure.** The biochemical part of the studies presented in this paper was supported by RFBR grant №17-04-01267.

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

Received 16 May 2018

Accepted 15 Oct 2018

## Введение

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) — редкое заболевание, которое встречается с частотой 4:1 000 000 населения, характеризуется быстро прогрессирующим течением и высокой летальностью при отсутствии лечения (до 90%) [1].

В 1924 г. E. Moschcowitz впервые описал у 16-летней девушки заболевание, сопровождавшееся высокой лихорадкой, острым внутрисосудистым гемолизом, геморрагической пурпурой, комой и смертью через 2 нед от дебюта заболевания. На вскрытии были выявлены множественные гиалиновые (тромбоцитарные) тромбы в терминальных артериолах и капиллярах [2].

Первый шаг к пониманию патогенеза заболевания был сделан в 1982 г., когда J. Moake обнаружил «необычно крупные» мультимеры фактора фон Виллебранда (vWF) в сыворотке пациентов с семейной формой ТТП и выдвинул гипотезу об отсутствии у них протеазы или дисульфидной редуктазы, расщепляющей эти макромолекулы [3].

vWF синтезируется в клетках эндотелия и мегакариocyтах, производящих тромбоциты. Основное количество секретируется в кровь эндотелием из специализированных везикул — телец Вейбеля—Паладе. vWF представляет собой группу высокомолекулярных гликопротеинов плазмы крови — мультимеров,

образованных из разного числа одинаковых белковых субъединиц (мономеров). Масса наиболее крупных мультимеров (гипермультимеров) доходит до 20 тыс. кДа. Перед поступлением в кровь предшественник зрелого белка проходит стадию частичного протеолитического расщепления под воздействием металлопротеазы. В результате в плазме vWF представлен в виде набора мультимеров массой от нескольких сот до нескольких тысяч килодальтонов. Каждый мультимер способен связываться с тромбоцитами или клетками поврежденного эндотелия. Наибольшей тромбогенной активностью обладают гипермультимеры. Сдвиг мультимерного состава в сторону накопления гипермультимеров приводит к развитию тромботических микроангиопатий. Напротив, сниженная масса мультимеров характерна для болезни фон Виллебранда.

В 1996 г. у больных, страдающих ТТП, был выявлен дефицит протеазы [4–5], что подтвердило гипотезу J. Moake. В 1997 г. Furlan et al. сообщили о наблюдении 4 больных с ТТП и глубоким дефицитом металлопротеазы, отвечающей за расщепление vWF [6].

В 1998 г. в двух независимых ретроспективных исследованиях было показано, что в 20 из 24 [7] и 37 из 37 [8] случаях рецидивирующей ТТП в сыворотке больных наблюдался дефицит протеазы. В 2001 г. эта металлопротеаза была выделена и идентифицирована как ADAMTS-13 (*a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, member 13*) [9–10].

Таким образом, в основе развития ТТП лежит глубокий дефицит (<10%) ADAMTS-13 [6, 11–14], что приводит к нарушению нормального расщепления vWF. Циркуляция в кровотоке гипермультимеров vWF приводит к образованию тромбоцитарных тромбов в мелких сосудах различных органов.

В 1966 г. E. L. Amorosi была предложена диагностическая пентада симптомов:

- 1) тромбоцитопения;
- 2) микроангиопатическая гемолитическая анемия;
- 3) лихорадка;
- 4) транзиторные неврологические нарушения;
- 5) повреждение почек [1].

Однако все 5 клинических симптомов заболевания встречаются далеко не всегда. Наличие тромбоцитопении и микроангиопатической гемолитической анемии, не связанных с другой патологией или клинической причиной, достаточно для того, чтобы заподозрить ТТП и незамедлительно начать лечение [15–16].

Выделяют врожденную и приобретенную формы ТТП. Приобретенную форму ТТП подразделяют на иммунную и вторичную (неиммунную). Иммунная форма составляет 50–55% случаев ТТП и вызвана ингибированием ADAMTS-13 аутоантителами, преимущественно класса G. Вторичная форма ТТП может быть связана с онкологическими заболеваниями, трансплантацией органов и тканей, аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, приемом лекарственных препаратов,

беременностью [17]. Врожденная форма болезни, или синдром Апшо—Шульмана (Upshaw—Schulman), составляет около 2% всех случаев заболевания и обусловлена мутациями в гене ADAMTS-13 [12]. Диагноз подтверждается при активности ADAMTS-13 менее 10% и отсутствии ингибитора ADAMTS-13 [18]. В литературе описано более 150 различных мутаций, сопровождающих это заболевание. Большинство из них (86%) приводит к снижению секреции ADAMTS-13 [19].

Важное значение имеет раннее начало лечения, поскольку в отсутствие адекватной терапии летальность может достигать 90% [1]. Лечение высокообъемными плазмообменами с замещением удаляемых объемов переливаниями донорской свежезамороженной плазмы (СЗП) снизило смертность при ТТП до 10–20% [20].

Плазмаферез в лечении ТТП позволяет: а) элиминировать антитела к ADAMTS-13 из крови пациента, б) элиминировать ультрамультимеры vWF, в) восполнить дефицит ADAMTS-13 за счет трансфузии донорской плазмы. Однако, несмотря на проведение лечебного плазмафереза, у одной трети пациентов возникает рецидив заболевания [21].

Аутоиммунный генез приобретенной формы ТТП дает возможность использования в лечении иммуносупрессивных препаратов. С этой целью применяют глюкокортикостероидные гормоны, внутривенный нормальный человеческий иммуноглобулин, цитостатики (винкристин) и анти-CD20 моноклональные антитела (ритуксимаб).

В последние годы в лечении ТТП все чаще используют анти-CD20 моноклональные антитела, особенно в тех случаях, когда болезнь характеризуется множественными рецидивами. Ритуксимаб применяют с целью блокирования производства анти-ADAMTS13 антител вследствие истощения пула В-лимфоцитов. Froissart et al. [22] опубликовали результаты проспективного исследования эффективности ритуксимаба (1 раз в неделю по 375 мг/м<sup>2</sup> — от 2 до 13 введений) у больных с ТТП. В исследование были включены 22 взрослых пациента без эффекта или с рецидивом ТТП после терапии плазмаферезами. Показано достоверное уменьшение периода от начала лечения до наступления ремиссии заболевания и отсутствие рецидивов в первый год терапии.

Единственными методами терапии ТТП, получившими доказательства эффективности в больших рандомизированных исследованиях, остаются плазмообмен и трансфузии СЗП.

При подозрении на ТТП, обусловленном наличием тромбоцитопении и микроангиопатической гемолитической анемии, необходимо срочное лечение, поскольку позднее начало терапии приводит к ранней смертности пациентов. В 1991 г. рабочая группа по аферезу из Канады (Canadian Apheresis Group) продемонстрировала преимущество выживаемости пациентов, получавших лечение плазмаферезом, перед паци-

ентами, получавшими только трансфузии СЗП [15]. В настоящее время одобренная большинством экспертов базисная терапия ТТП включает ежедневный плазмообмен [24–26]. При отсутствии возможности экстренного плазмообмена показано переливание больших доз СЗП (20–30 мл/кг массы тела в сутки). Достижением ремиссии заболевания считается регресс клинических симптомов, нормализация числа тромбоцитов, стабилизация уровня гемоглобина, уменьшение сывороточной концентрации лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [27]. Наиболее важным признаком ответа на лечение считается увеличение числа тромбоцитов до нормального значения. Терапию следует продолжать как минимум в течение 2 дней после достижения эффекта [21].

После отмены лечения необходим тщательный мониторинг динамики показателей тромбоцитов. По данным различных авторов, в 20–50% случаев заболевание приобретает рецидивирующее течение [21, 28, 29].

Врожденная ТТП — более редкая форма заболевания. Всего описано около 100 пациентов во всем мире. Для больных с врожденной формой ТТП характерно устойчиво низкое содержание ADAMTS-13 в сыворотке крови. Заболевание может протекать бессимптомно до развития провоцирующих событий (инфекции, прививки, употребление алкоголя, беременность).

Радикальных методов лечения врожденной формы ТТП, позволяющих достичь длительного эффекта, до сих пор не существует. Продолжается активное изучение рекомбинантного ADAMTS-13 (rADAMTS-13). Antoine et al. продемонстрировали *in vitro* активность rADAMTS-13 для расщепления ультрамультимеров vWF в плазме пациентов с врожденной формой ТТП [23]. В 2012 г. группа ученых из Австрии доказала эффективность использования человеческого rADAMTS-13 на мышинных моделях ТТП [41]. В настоящее время проводится первая фаза открытого многоцентрового исследования rADAMTS-13 с целью оценки фармакокинетики и безопасности применения у пациентов с врожденной формой ТТП [42].

Для врожденной ТТП свойственно непрерывно-рецидивирующее течение. Эпизоды обострения болезни обычно происходят раз в 3–4 нед, что требует профилактического проведения регулярных трансфузий СЗП (10–15 мл/кг массы тела).

СЗП содержит весь комплекс компонентов свертывающей системы, системы комплемента, иммуноглобулины, другие белки, липиды, углеводы и неорганические вещества. Показания к трансфузии СЗП включают дефицит факторов свертывания (при отсутствии специфического препарата), синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, сепсис, тяжелое поражение печени и ТТП. Трансфузии всех компонентов крови, в том числе и СЗП, могут сопровождаться нежелательными последствиями. К ним относятся анафилактическая реакция, токсичность цитрата, инфицирование вирусными заболеваниями.

До 21% переливаний СЗП сопровождается аллергическими реакциями [30]. Клинические проявления могут варьировать от легких симптомов до отека Квинке и анафилактического шока. Нечастым, но наиболее опасным для жизни реципиента осложнением бывает острое посттрансфузионное повреждение легких, которое чаще развивается при трансфузиях донорской плазмы, чем других компонентов крови. Проанализировав около 200 тыс. трансфузий, Popovsky и Moore [31] установили, что острое посттрансфузионное повреждение легких является наиболее вероятным осложнением, которое приводит к смерти, но, как правило, не диагностируется. Частота встречаемости острого посттрансфузионного повреждения легких — примерно один случай на каждые 5000 трансфузий [31, 32]. Возникновение острого посттрансфузионного повреждения легких связано с наличием в переливаемых компонентах крови донора специфических антител к антигенам HLA I и II классов.

В связи с необходимостью регулярных трансфузий СЗП при рецидивирующей приобретенной или врожденной форме ТТП решение вопроса об инфекционной безопасности реципиента становится особенно актуальным. В литературе есть сведения о том, что частота трансмиссии вирусных заболеваний при трансфузиях компонентов крови возрастает для реципиентов с 3,6 до 36 случаев на 1000 пациентов при увеличении числа доноров от 1 до 8 [33].

Существует несколько направлений повышения инфекционной безопасности трансфузий. В первую очередь это формирование кадровых безвозмездных доноров. Риск передачи гемотрансмиссивных инфекций выше при привлечении доноров-родственников и платных доноров [34–37]. Следующий шаг — лабораторная диагностика вирусов. В настоящее время внедряются технологии микрочипов в лабораторной вирусологической диагностике, которые позволят расширить спектр одновременно анализируемых патогенов и выполнять множество анализов параллельно. Но и эти меры не исключают полностью риск инфицирования. Связано это с наличием фазы серонегативного окна, мутантных или вариантных форм вируса и с вероятностью неполного ответа на инфекцию у доноров. Для СЗП карантинизация, предусматривающая обязательное обследование донора через 6 мес после плазмодачи, полностью нивелирует сероконверсивное окно. Однако ограниченный спектр тестируемых вирусов допускает передачу герпесвирусов, Т-лимфотропного вируса человека, вируса Западного Нила, вирусов других гепатитов, парвовируса В19 и т. д. Для решения этой проблемы внедрены и широко используются различные методы инактивации патогенов в компонентах крови. Таким образом, тщательный отбор доноров, лабораторное обследование, карантинизация и инактивация патогенов в компонентах крови позволяют максимально снизить риск инфицирования реципиента [37–40].

Цель данной работы — выработать рациональный режим заместительной терапии больного ТТП на основании клинических проявлений и лабораторных данных. Оценить эффективность и безопасность длительного применения СЗП.

## Описание клинического случая

Мужчина 23 лет (1983 г. р.) обратился к врачу в апреле 2006 г., когда на фоне вирусной инфекции и повышения температуры тела до 38 °С на коже появились мелкоочечные геморрагические высыпания. Со слов больного, подобные высыпания наблюдались и раньше при повышении температуры тела (количество тромбоцитов не исследовалось). При обследовании были выявлены тромбоцитопения ( $35 \times 10^9/\text{л}$ ) и анемия (гемоглобин 83 г/л). В пунктате костного мозга содержалось достаточное количество мегакариоцитов, красный росток был раздражен.

Больному был установлен диагноз иммунной тромбоцитопении и назначено лечение преднизолоном в дозе 120 мг/сут. Через месяц от начала терапии при сохраняющейся тромбоцитопении ( $30 \times 10^9/\text{л}$ ) у

пациента появилась клиническая картина нарушения мозгового кровообращения, которая сопровождалась моторной афазией, ретроградной амнезией, нарушением сознания. В последующем развился правосторонний гемипарез. Возникшее осложнение было расценено как геморрагический инсульт в левой гемисфере. Однако по результатам компьютерной томографии головного мозга очагов кровоизлияния или ишемии выявлено не было, описанные симптомы спонтанно исчезли в течение суток. В июле 2006 г. впервые был госпитализирован в Гематологический научный центр (ГНЦ) в связи с геморрагическим синдромом (петехии на коже) и выраженной тромбоцитопенией. В гемограмме отмечались снижение концентрации гемоглобина до 76 г/л, выраженный ретикулоцитоз 62%, тромбоцитопения  $4 \times 10^9/\text{л}$ . Были обнаружены шизоциты и нормобласты (6:100). Пунктат костного мозга был гиперклеточный с большим числом мегакариоцитов и признаками раздражения красного ростка. Отмечалось повышение уровня vWF до 170% с наличием гипермультимеров (рис. 1), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) составляло 27 с, определялись повышенная сывороточная концентрация ЛДГ (3647 ед/л) и признаки почечной дисфункции (сывороточные концентрации мочевины 15,8 ммоль/л, креатинина — 104 мкмоль/л, протеинурия — 0,2 г/л).

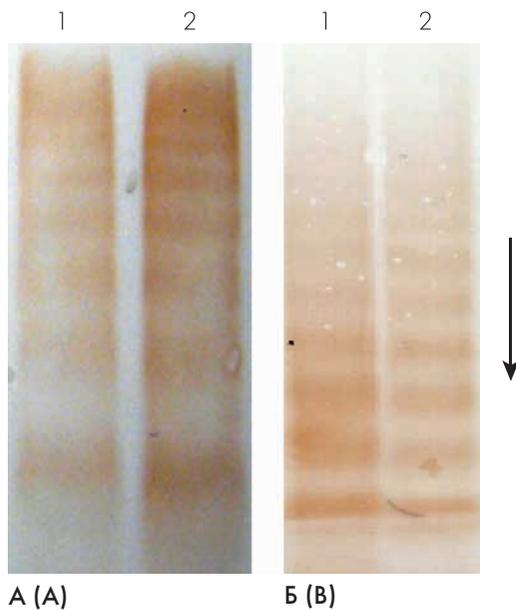
На основании тромбоцитопении, гемолитической анемии, транзиторных неврологических нарушений в анамнезе, поражения почек, повышения уровня vWF (170%) с наличием его ультрамультимеров был установлен диагноз: тромботическая тромбоцитопеническая пурпура.

После проведения двух плазмообменов состояние пациента улучшилось — исчез геморрагический синдром, увеличилось количество тромбоцитов до  $134 \times 10^9/\text{л}$ , концентрация ЛДГ снизилась до 1515 ед/л. Преднизолон был полностью отменен. Суммарно проведено 9 сеансов плазмообмена, объемы удаленной и замещенной плазмы составили 11 л.

Через месяц пациент был выписан в удовлетворительном состоянии, без анемического и геморрагического синдромов. В гемограмме: гемоглобин 126 г/л, тромбоциты  $188 \times 10^9/\text{л}$ , ЛДГ 617 ед/л.

Через две недели после выписки у больного развился рецидив заболевания. Из клинических проявлений отмечался геморрагический синдром, лабораторная картина соответствовала обострению ТТП. Было проведено 2 сеанса плазмообмена, и больной был выписан домой в стабильном состоянии без признаков заболевания, количество тромбоцитов составляло  $247 \times 10^9/\text{л}$ .

В процессе наблюдения рецидивы развивались с частотой 1 раз в 3—4 нед и купировались проведением одного сеанса плазмафереза в объеме 1000 мл с замещением удаленного объема СЗП (500—600 мл). Несмотря на сравнительно частые эпизоды ухудшения, больной не нуждался в госпитализации. Однако не-



**Рисунок 1.** Мультимеры фактора фон Виллебранда контрольной плазмы (1) и плазмы пациента (2) после электрофоретического разделения и вестерн-гибридизации. Взятые образцы плазмы пациента до начала лечения в 2006 г. (А) и в 2014 г. через 8 лет после начала плазмообмена (Б). В последнем случае плазма пациента взята на 21-й день после трансфузии непосредственно перед очередной процедурой плазмообмена. Стрелкой обозначено направление движения мультимеров в электрическом поле.

**Figure 1.** Multimers of von Willebrand factor of control plasma (1) and patient plasma (2) after electrophoretic separation and Western-blot hybridization. Patient plasma samples were taken before treatment in 2006 (A) and in 2014 8 years after the start of plasma exchange (B). In the latter case, the patient's plasma was taken on day 21 after transfusion just before the next plasma exchange (PE) procedure. The arrow indicates the direction of motion of the multimers in the electric field.

комплаентность пациента приводила к тому, что он обращался в клинику только при развитии геморрагического синдрома. Количество тромбоцитов к моменту визита в среднем составляло  $17 \times 10^9/\text{л}$  ( $7\text{--}34 \times 10^9/\text{л}$ ). Удлинение интервалов между процедурами плазмафереза приводило к развитию серьезных осложнений, требовавших экстренной госпитализации.

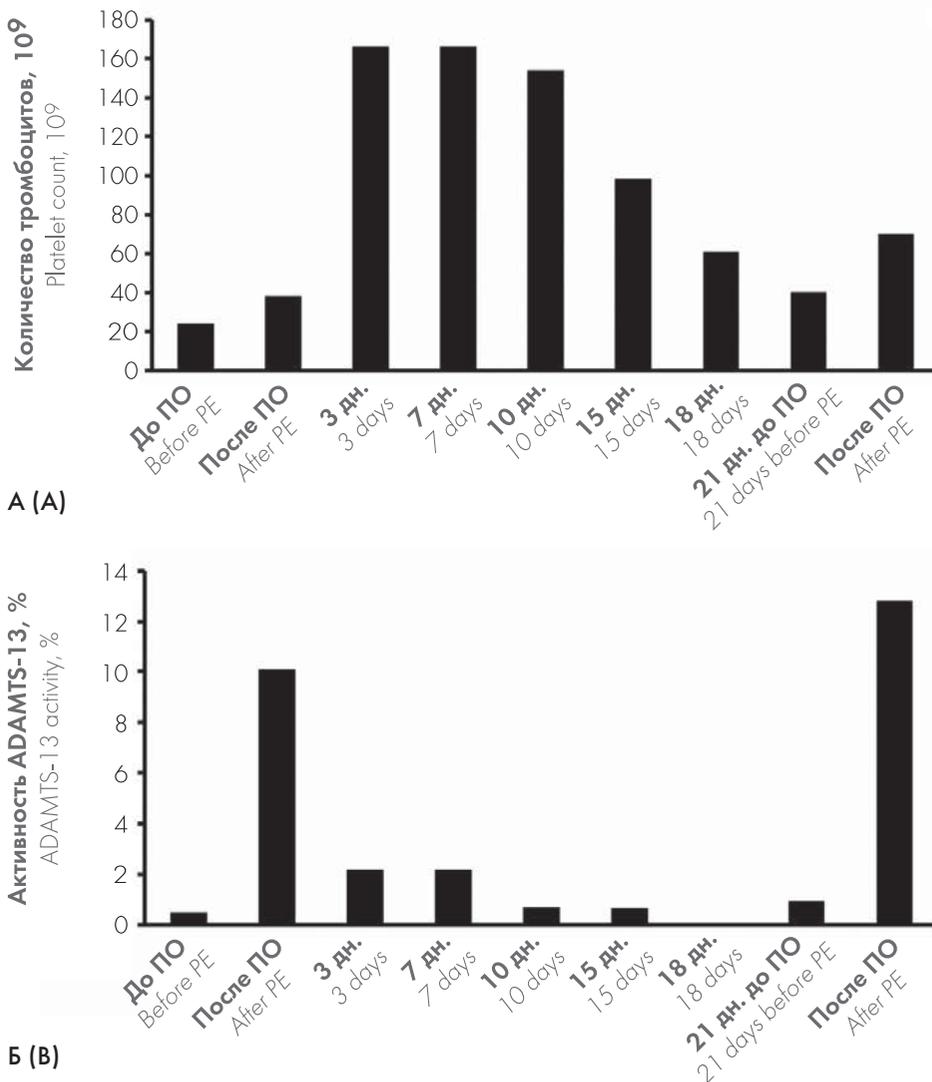
В октябре 2009 г. и декабре 2010 г. больной был госпитализирован с клинической картиной острой почечной недостаточности (ОПН), сопровождавшейся олигурией, повышением сывороточной концентрации креатинина до  $1172 \text{ мкмоль/л}$ , мочевины — до  $41 \text{ ммоль/л}$ .

В июне 2010 г. пациент был госпитализирован в инфекционную больницу с жалобами на боли в правом подреберье, выраженную желтушность кожного покрова и склер, потемнение мочи. При обследовании были обнаружены гипербилирубинемия до  $282 \text{ мкмоль/л}$  (связанный  $194 \text{ мкмоль/л}$ , свободный  $88 \text{ мкмоль/л}$ ), повышение аспартатаминотрансферазы до  $342 \text{ ед/л}$ , АЛТ до  $505 \text{ ед/л}$  и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы до  $267 \text{ ед/л}$ , тромбоцитопения ( $8 \times 10^9/\text{л}$ ). Концентрация гемоглобина была  $147 \text{ г/л}$ . Таким образом, наблюдалась пече-

ночная дисфункция на фоне обострения ТТП. Пациенту было проведено 2 сеанса плазмообмена суммарным объемом  $3,8 \text{ л}$ . В результате лечения состояние улучшилось, исчезли симптомы и лабораторные признаки поражения печени.

Причиной осложнений было удлинение (более месяца) интервалов между сеансами плазмафереза вследствие беспечного отношения пациента к лечебному процессу. В результате произошедших осложнений удалось преодолеть некомплаентность больного, и в дальнейшем сеансы плазмафереза проводились строго 1 раз в 3 нед.

В 2014 г. пациент повторно обследован с целью определения тактики оптимального лечения. Проведено исследование количества тромбоцитов в динамике между сеансами плазмафереза. Установлено, что количество тромбоцитов снижалось менее  $100 \times 10^9/\text{л}$  приблизительно через 2 нед после плазмафереза и менее  $50 \times 10^9/\text{л}$  — по прошествии 3 нед (рис. 2, А). Плазменная активность ADAMTS-13 перед инфузией находилась на нулевом уровне, после введения плазмы возрастала до 10–12% (рис. 2, Б). В течение первой недели актив-



**Рисунок 2.** Количество тромбоцитов (А) и активность ADAMTS-13 (Б) до и в разные дни после плазмообмена (ПО).  
**Figure 2.** The number of platelets (A) and the activity of ADAMTS-13 (B) before and after plasma exchanges (PE).

ность металлопротеазы падала до 2%, в последующие дни до инфузии — колебалась в области фоновых значений. Проведен анализ мультимерного состава vWF перед трансфузией — содержание мультимеров в плазме пациента не превышало уровня в контрольной плазме здорового (см. рис. 1, Б). При исследовании плазмы пациента ингибитора ADAMTS-13 не выявлено. По результатам исследования, а также на основании анамнеза установлена врожденная форма ТТП. Учитывая форму заболевания, принято решение об отмене плазмаферезов и проведении плановых трансфузий СЗП с периодичностью 1 раз в 3 нед.

До настоящего времени пациенту проводятся трансфузии 500—600 мл СЗП с частотой 1 раз в 3 нед. На этом фоне состояние его удовлетворительное, количество тромбоцитов к моменту трансфузии в среднем составляет  $51 \times 10^9/\text{л}$  ( $37\text{—}87 \times 10^9/\text{л}$ ), без геморрагического синдрома.

## Обсуждение

Представленный клинический случай интересен продолжительностью (более 10 лет) наблюдения за пациентом с тяжелой формой врожденной ТТП, постоянно требовавшей заместительной терапии СЗП. Всего за время наблюдения пациенту было проведено более 100 процедур плазмафереза, удалено более 130 л плазмы, перелито около 100 л СЗП.

Трансфузия СЗП, как и других компонентов крови, является потенциально опасным методом заместительной терапии. Осложнения трансфузии СЗП могут быть как непосредственными, так и отдаленными. К непосредственным относятся иммуноопосредованные реакции — аллергические, пирогенные негемолитические. В числе наиболее тяжелых осложнений трансфузий находятся трансмиссивные инфекции, в частности инфицирование вирусами гепатитов и вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Вероятность инфицирования вирусными гепатитами реципиентов с высокой трансфузионной нагрузкой возрастает в 2 раза и более [37].

Для трансфузий мы использовали только карантинизированную или вирусинактивированную СЗП, что значительно снижает риск инфицирования. Несмотря на большой объем трансфузий донорской плазмы, у пациента не выявлялись маркеры таких трансмиссивных инфекций, как гепатиты и ВИЧ. Из осложнений трансфузий СЗП за все время наблюдения пациента трижды возникала реакция в виде крапивницы, которая купировалась введением антигистаминных препаратов и преднизолона.

Несоблюдение интервалов между трансфузиями приводит к рецидиву заболевания и поражению таких органов-мишеней, как почки и печень. Мы наблюдали развитие таких осложнений ТТП, как ОПН и печеночная дисфункция. Все осложнения возникали при удлинении интервалов между процедурами плазмафереза и носили частично обратимый характер. На

фоне проводимой терапии в течение последних 6 лет у пациента развития осложнений не наблюдается. Он ведет активный образ жизни, учится и работает.

Необходимые интервалы между трансфузиями СЗП, учитывая сложность и труднодоступность метода определения уровня ADAMTS-13, могут быть определены по динамической оценке количества тромбоцитов. Для контроля заболевания в нашем случае оказалось достаточным поддержание количества тромбоцитов не ниже  $50 \times 10^9/\text{л}$ .

Описанный нами случай демонстрирует, что строгое соблюдение интервалов между трансфузиями СЗП позволяет избежать тяжелых осложнений со стороны органов и систем, приводящих к инвалидизации пациентов.

## Информация об авторах

Накастоев Ислам Мухарбекович (Nakastoev I. M.), кандидат медицинских наук, врач-гематолог, научный сотрудник отделения химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, slep06@gmail.com

Авдонин Петр Павлович (Avdonin P. P.), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии рецепторов и сигнальных систем, отдел физиологии, Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, ppavdonin@gmail.com

Грибанова Елена Олеговна (Gribanova E. O.), кандидат медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, el.gribanova@mail.ru

Калинин Николай Николаевич (Kalinin N. N.), доктор медицинских наук, заведующий отделением экстракорпоральных методов лечения, МНОЦ МГУ им. М. В. Ломоносова, kalinin2006@mail.ru

Цветаева Нина Валентиновна (Tsvetaeva N. V.), кандидат медицинских наук, врач-гематолог, ведущий научный сотрудник отделения орфанных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, tsvetaeva.n@blood.ru

Калинина Ирина Игоревна (Kalinina I. I.), кандидат медицинских наук, врач-гематолог, заместитель заведующего отделением детской гематологии/онкологии, врач-гематолог приемного отделения ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева», burbir@mail.ru

Канаева Мадина Лечиевна (Kanaeva M. L.), врач-гематолог отделения химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, madinasatto@gmail.com

Журавлев Владимир Владимирович (Zhuravlev V. V.), кандидат медицинских наук, врач-трансфузиолог, заведующий отделением клинической трансфузиологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, zhuravlev.v@blood.ru

Бирюкова Людмила Семеновна (Biryukova L. S.), доктор медицинских наук, профессор, врач-нефролог, заведующая отделением гемодиализа

за и полиорганной патологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, biryukova.l@blood.ru

**Авдонин Павел Владимирович** (Avdonin P. V.), доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии рецепторов и сигнальных систем, отдел физиологии, Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, pvavdonin@yandex.ru

**Рыжко Вячеслав Владимирович** (Ryzhko V. V.), кандидат медицинских наук, врач-гематолог, старший научный сотрудник отделения химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ryzhko.v@blood.ru

## Литература

34. Степанов А. А., Коротаев Е. В., Рабинович В. И., Астахова Л. П., Пономарев С. А. Организационные аспекты противoinфекционной безопасности трансплантационного материала при ауто-трансплантации гемопоэтических стволовых клеток периферической крови. Вестник гематологии. 2012; VIII-1:82–83.
35. Нестерова Е. С., Ковригина А. М., Гемдзян Э. Г., Магомедова А. У., Барях Е. А., Чернова Н. Г., Марьин Д. С., Гаврилина О. А., Лукина А. Е., Васильева К. С., Кравченко С. К. Опыт применения высокодозной терапии с последующей ауто-ТСКК при фолликулярной лимфоме в первой линии терапии. Гематология и трансфузиология. 2014; 59(S1):54–55.
36. Нестерова Е. С., Кравченко С. К., Гемдзян Э. Г. и др. Итоги десятилетнего опыта лечения больных фолликулярной лимфомой. Гематология и трансфузиология. 2012; 5:3–8.
37. Гармаева Т. Ц., Куликов С. М., Михайлова Е. А., Гемдзян Э. Г., Гапонова Т. В., Грумбова Л. О. и др. Долгосрочные результаты инфицированности вирусами гепатитов В и С больных с заболеваниями системы крови. Терапевтический архив. 2011; 7:17–25.
38. Накостоев И. М., Грачев А. Е., Гемдзян Э. Г., Цыба Н. Н., Журавлев В. В., Городецкий В. М. и др. Влияние патогенинактивации концентратов тромбоцитов на частоту посттрансфузионных реакций и клиническую эффективность трансфузий. Трансфузиология. 2014; 2:86–87.
39. Грачев А. Е., Накостоев И. М., Гемдзян Э. Г., Журавлев В. В., Рыжко В. В. Влияние длительности криоконсервирования эритроцитов на их качество и эффективность их трансфузий. Гематология и трансфузиология. 2013; 2:32–36.
40. Жибурт Е. Б., Губанова М. Н., Шестаков Е. А., Максимов В. А. «Новые» гемотрансмиссивные инфекции и их профилактика. Трансфузиология. 2006; 4:56–67.

Остальные источники см. в References.

## References

1. Amorosi E. L., Ultmann J. E. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Medicine* 1966;45:139–59.
2. Moschcowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc NY Pathol Soc* 1924; 24:21–4. Reprinted in: *Mt Sinai J Med* 2003;70:352–355.
3. Moake J. L., Rudy C. K., Troll J. H. et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *NEJM* 1982; 307:1432–35.

4. Furlan M., Robles R., Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996; 87(10):4223–4234.
5. Tsai H. M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996; 87(10):4235–4244.
6. Furlan M., Robles R., Solenthaler M. et al. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997; 89:3097–3103.
7. Furlan M., Robles R., Galbusera M. et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339:1578–1584.
8. Tsai H. M., Lian E. C. Y. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *NEJM* 1998; 339:1585–1594.
9. Fujikawa K., Suzuki H., McMullen B., Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*. 2000; 98(6):1662–1666.
10. Zheng X., Chung D., Takayama T. K. et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*. 2001; 276(44):41059–41063.
11. Zheng X., Chung D., Takayama T. K. et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001; 276:41059–41063.
12. Levy G. G., Nichols W. C., Lian E. C. et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413:488–494.
13. Moake J. L. Mechanisms of disease: thrombotic microangiopathies. *NEJM* 2002; 347:589–600.
14. Veyradier A., Obert B., Houllier A. et al. Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* 2001; 98:1765–1772.
15. Scully M., Yarranton H., Liesner R. et al. Regional UK TTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br J Haematol*. 2008; 142(5):819–826.
16. Chang J. C., Kathula S. K. Various clinical manifestation in patients with thrombotic microangiopathy. *Journal of Investigative Medicine* 2002; 50:201–206.
17. Peyvandi F., Ferrari S., Lavoretano S. et al. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2004; 127:433–439.
18. George J. N. Forecasting the future for patients with hereditary TTP. *Blood*. 2012; 120(2):243–244.
19. Underwood M., Peyvandi F., Garagiola I. et al. Degradation of two novel congenital TTP ADAMTS13 mutants by the cell proteasome prevents ADAMTS13 secretion. *Thrombosis research*, 2016; 147:16–23.
20. Rock G. A., Shumak K. H., Buskard N. A. et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med*. 1991; 325(6):393–397.
21. Bandarenko N., Brecher M. E. United States Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Apheresis Study Group (US TTP ASG): multicenter survey and retrospective analysis of current efficacy of therapeutic plasma exchange. *J Clin Apheresis*. 1998; 13:133–141.

22. Froissart A., Buffet M., Veyradier A. et al. Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med.* 2012; 40(1):104–111.
23. Antoine G., Zimmermann K., Plaimauer B. et al. ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13. *Br J Haematol.* 2003; 120:821–824.
24. Scully M., Hunt B. J., Benjamin S. et al., British Committee for Standards. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol.* 2012; 158:323–335.
25. George J. N. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood.* 2010; 116:4060–4069.
26. Sarode R., Bandarenko N., Brecher M. E. et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura: 2012 American Society for Apheresis (ASFA) consensus conference on classification, diagnosis, management, and future research. *J Clin Apher.* 2014; 29:148–167.
27. Guidelines of the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias. *Br J Haematol.* 2003; 120(4):556–573.
28. Shumak K. H., Rock G. A., Nair R. C. Late relapses in patients successfully treated for thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Group. *Annals of Internal Medicine.* 1995; 122:569–572.
29. Willis M. S., Bandarenko N. Relapse of thrombotic thrombocytopenic purpura: is it a continuum of disease? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2005; 31:700–708.
30. Mokrzycki M. H., Kaplan A. A. Therapeutic plasma exchange: complications and management. *Am J Kidney Dis* 1994; 23:817–827.
31. Popovsky M. A., Abel M. D., Moore S. B. Transfusion – related acute lung injury associated with passive transfer of anti-leukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:185–189; Popovsky M. A., Moore S. B. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 1985; 25:573–577.
32. Eder A. F., Benjamin R. J. TRALI risk reduction: donor and component management strategies. *Ref J Clin Apher.* 2009; 24(3):122–129.
33. McCullough J. *Transfusion medicine*, 3rd edition, Wiley-Blackwell, 2012.
34. Stepanov A. A., Korotaev E. V., Rabinovich V. I. et al. Organizational aspects of anti-infectious safety of transplantation material during transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *The Bulletin of Hematology.* 2012; VIII-1:82–83 (in Russian).
35. Nesterova E. S., Kovrigina A. M., Gemdzhyan E. G. et al. Experience in the use of high-dose therapy with subsequent HSCT with follicular lymphoma in the first-line therapy. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology.* 2014; 59(S1):54–55 (in Russian).
36. Nesterova E. S., Kravchenko S. K., Gemdzhyan E. G. et al. Results of a decade of experience in treating patients with follicular lymphoma. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology.* 2012; 5:3–8 (in Russian).
37. Garmeva T. C., Kulikov S. M., Mihajlova E. A. et al. Long-term results of infection with hepatitis B and C viruses in patients with diseases of the blood system. *Terapevticheskii arkhiv.* 2011; 7:17–25 (in Russian).
38. Nakastoev I. M., Grachev A. E., Gemdzhyan E. G. et al. The effect of pathogeninactivation of platelet concentrates on the frequency of post-transfusion reactions and clinical efficacy of transfusions. *Transfusiology.* 2014; 2:86–87 (in Russian).
39. Grachev A. E., Nakastoev I. M., Gemdzhyan E. G. et al. The effect of the duration of red blood cells cryoconservation on their quality and the efficiency of their transfusions. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology.* 2013; 2:32–36 (in Russian).
40. Zhiburt E. B., Gubanov M. N., Shestakov E. A., Maksimov V. A. „New“ blood-transmissible infections and their prevention. *Transfusiology.* 2006; 4:56–67 (in Russian).
41. Schiviz A., Wuersch K., Piskernik C. et al. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood* 2012; 119(25), 6128–6135.
42. Jilma-Stohlawetz P., Gilbert J. C., Gorczyca M. E. et al. Phase 1 dose escalation, single dose study to assess safety and pharmacokinetics of BAX930 in hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thrombosis and Haemostasis.* 2011; 106(3):539–547.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ПУБЛИКАЦИЙ В ЖУРНАЛЕ «ГЕМАТОЛОГИЯ И ТРАНСФУЗИОЛОГИЯ / RUSSIAN JOURNAL OF HEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY»

Журнал «Гематология и трансфузиология» публикует оригинальные и фундаментальные исследования, лекции, обзоры и клинические наблюдения, касающиеся различных разделов гематологии, гемостазиологии и трансфузиологии: физиология и патофизиология кроветворения, миелопоэза, иммуногематологии, состояния и заболевания, обусловленные нарушениями функции и количества тромбоцитов, врожденные и приобретенные нарушения коагуляции и фибринолиза, тромбозы, тромбофилии, вопросы терапии антикоагулянтами и дезагрегантами, вопросы онкогематологии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, генной терапии, экспериментальной биологии и экспериментальной терапии, эпидемиологические исследования при заболеваниях системы крови, интенсивная терапия критических состояний, возникающих при заболеваниях системы крови, вопросы производственной трансфузиологии, а именно получение и тестирование компонентов крови, их клиническое применение при различных заболеваниях и другие проблемы.

Журнал адресован гематологам, трансфузиологам, работникам службы крови, врачам-лаборантам, терапевтам, хирургам, педиатрам, анестезиологам, реаниматологам, а также физиологам, патофизиологам, патологам, иммунологам, биологам и профессионалам смежных специальностей.

При начальной проверке статьи, выполняемой после ее поступления в редакцию журнала, редакция оценивает, соответствует ли статья правилам оформления, изложенным в инструкции для авторов, тематике журнала, имеет ли научную ценность и может ли быть направлена на рецензирование. Статьи, не соответствующие правилам оформления и тематике журнала, не имеющие научной ценности, возвращаются авторам без дальнейшего рецензирования.

Не принимаются к публикации работы, ранее опубликованные или направленные в иные издания. Редакция оставляет за собой право проверить статьи на плагиат. Плагиатом признается статья, где сходство с опубликованной работой составляет более 20%. Редакция оставляет за собой право отклонять без рецензии статьи, не соответствующие профилю журнала или оформленные с нарушением правил.

Статьи, прошедшие предварительную оценку редакцией, подвергаются «слепому» рецензированию. Рукопись, получившая отрицательные отзывы двух независимых рецензентов, решением редколлегии отклоняется.

Статья, нуждающаяся в доработке, направляется авторам с замечаниями рецензента и научного редактора. Авторы должны учесть все замечания, сделанные в процессе рецензирования и редактирования статьи, ответить на каждое из замечаний и указать место в рукописи, где сделаны изменения. В случае несогласия с рецензентом или редактором автор должен кратко и четко обосновать свою позицию. Сделанные автором изменения в рукописи необходимо внести в электронный вариант текста, выделив его цветом, и вернуть в редакцию. После доработки статья повторно рецензируется, **и редколлегия принимает решение о возможности или невозможности ее публикации.**

Авторы обязаны удалить из фотографий и рукописей персональную информацию о пациенте, по которой его можно идентифицировать. Если это сделать невозможно, то предоставляемые материалы должны сопровождаться подписанным согласием пациента на публикацию этих материалов.

Фактом подачи статьи и сопровождающих файлов (далее Произведение) к публикации в журнале автор, а также все авторы данного Произведения, если оно создано в соавторстве, согласны с тем что предоставляют редакции журнала «Гематология и трансфузиология» (Russian Journal of Hematology and Transfusiology) исключительное и бессрочное право на использование Произведения на безвозмездной основе на территории России и зарубежных стран в следующих пределах и объеме:

1. Публикация Произведения в бумажном и/или электронном формате.
2. Производство репринтов Произведения.
3. Размещение Произведения в сети Интернет как в открытом, так и платном доступе.
4. Отправка метаданных Произведения или полных текстов в различные индексирующие базы данных и депозитарии.
5. Воспроизведение Произведения, то есть изготовление одного и более экземпляра Произведения или его части в любой материальной форме, в том числе в виде звуко- или видеозаписи (запись Произведения на электронном носителе также считается воспроизведением).
6. Распространение Произведения путем продажи или иного отчуждения его оригинала или экземпляров.
7. Публичный показ Произведения, то есть любая демонстрация оригинала или экземпляра Произведения непосредственно либо на экране с помощью технических средств, а также демонстрация отдельных кадров аудиовизуального Произведения без соблюдения их последовательности непосредственно либо с помощью технических средств в месте, открытом для свободного посещения, или в месте, где присутствует значительное число лиц, независимо от того, воспринимается Произведение в месте его демонстрации или в другом месте.
8. Импорт или экспорт Произведения или его частей в любых законных целях как на платной, так и на безвозмездной основе в целях распространения.
9. Перевод или другая переработка Произведения.
10. Доведение Произведения до всеобщего сведения таким образом, что любое лицо может получить к нему доступ из любого места и в любое время по собственному выбору.
11. Размещение Произведения либо его частей в различных сборниках аналогичных произведений.
12. Предоставление прав, предусмотренных настоящей статьёй, в полном объеме или в части третьим физическим и юридическим лицам как на платной, так и на безвозмездной основе.

## ПОДАЧА СТАТЬИ В РЕДАКЦИЮ

Статья может быть написана на русском и/или английском языке. Редакция оставляет за собой право на сокращение и редактирование присланных статей. Датой поступления статьи считается время поступления в редакцию окончательного варианта статьи.

В конце каждой статьи должны стоять подписи всех авторов статьи, которые тем самым подтверждают свое участие и согласие с изложенным в статье материалом. В случае, если статья высылается по электронной почте, должен быть выслан отсканированный вариант, на котором видны подписи всех авторов.

**Рукописи статей и сопроводительные документы могут быть поданы в редакцию одним из следующих способов:**

1. По электронной почте по адресу [ht@htjournal.ru](mailto:ht@htjournal.ru). Текст статьи подается в формате Word, а сопроводительные документы, включая страницу, подписанную всеми авторами статьи, должны быть отсканированы и прикреплены к письму.
2. По обычной почте, при этом подается распечатанный вариант статьи, оригиналы сопроводительных документов и полный вариант статьи на электронном носителе. Статьи, поданные без электронного носителя, рассматриваться не будут.

## Каждая статья должна иметь титульный лист, содержащий следующую информацию:

- название статьи на русском и английском языках;
- фамилия и инициалы авторов на русском и английском языках;
- полное наименование учреждения, в котором работает каждый из авторов, с указанием ведомственной принадлежности учреждения, на русском и английском языках. Если авторов несколько, у каждой фамилии и соответствующего учреждения проставляется цифровой индекс. Если все авторы статьи работают в одном учреждении, указывать место работы каждого автора отдельно не нужно. Если у автора несколько мест работы, каждое обозначается отдельным цифровым индексом;
- фамилия, полное имя и отчество каждого из авторов с указанием должности и электронного адреса;
- учетная запись ORCID каждого из авторов.

## В ЖУРНАЛЕ ПУБЛИКУЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ВИДЫ РАБОТ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Статьи, освещающие результаты собственных оригинальных исследований. Размер оригинальных статей не должен превышать 5000 слов (только текст статьи, без титульного листа, списка литературы, таблиц и подписей под рисунками) и включать более 5 иллюстраций и 5 таблиц. В оригинальных статьях допускается до 40 литературных ссылок.

### Оригинальная статья должна состоять из следующих разделов

**Резюме** на русском и английском языках. Объем резюме — не более 300 слов. Резюме должно излагать только существенные факты работы, без общих слов. Резюме оригинальной статьи делится на следующие разделы:

- введение, в котором формулируется цель работы;
- материалы и методы;
- результаты;
- заключение.

**Ключевые слова** на русском и английском языках, отражающие основную тему статьи и облегчающие классификацию работы в поисковых системах. В ключевых словах должны быть отражены: объект, метод и область исследования, специфика работы.

**Введение** — в введении дается критический обзор литературных данных, определяются нерешенные проблемы, обосновываются актуальность, новизна и значимость проводимого исследования. В конце раздела «Введение» обязательно формулируется цель предстоящего исследования.

**Материалы и методы** — в этом разделе указываются дизайн исследования (проспективное, ретроспективное, рандомизированное, когортное, сравнительное, пилотное и т. д.), сроки, база проведенного исследования, критерии включения в исследование и исключения из него, использовавшиеся оборудование и методы. Если методы были описаны ранее, приводятся ссылки на источник литературы, где они были описаны. Описывается объект исследования. При необходимости оговаривается получение информированного согласия от участников исследования, одобрение этического комитета. Если нужно, приводится протокол исследования. В экспериментальных работах следует руководствоваться «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Помимо вида, пола и количества использованных животных авторы обязательно должны указывать применявшиеся при проведении болезненных процедур методы обезболивания и методы умерщвления животных. В конце раздела описываются статистические методы, использовавшиеся при обработке материала, расчет размера выборки на основе статистической мощности, определение нормальности распределения, модели логистического или линейного регрессионного анализа, статистический пакет, версия, в какой форме представлены результаты исследования (средняя, медиана, разброс, межквартильный интервал, стандартное отклонение и т. д.).

**Результаты** — в этом разделе кратко описываются результаты собственного исследования. Недопустимо приводить в этом разделе данные других исследований или сравнения с ними — для этого существует раздел «Обсуждение». Данные могут быть представлены в виде таблиц, графиков, рисунков. Данные, представленные в таблицах или на рисунках, не должны дублироваться в тексте.

**Обсуждение** — в этом разделе дается объяснение полученным результатам, сравниваются собственные данные и данные других авторов, объясняются выявленные феномены. В разделе не должны обсуждаться собственные данные, которые не представлены в разделе «Результаты».

**Заключение.** Статья должна заканчиваться коротким заключением (несколько строк), в котором авторы излагают основные результаты работы.

### Литература.

**Конфликт интересов.** Авторы обязуются сообщать о любых имеющихся или потенциальных конфликтах интересов. Конфликтом интересов может считаться любая ситуация, влияющая на автора статьи, которая может привести к искажению данных или изменить их трактовку. Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи, однако сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может явиться причиной отказа в публикации рукописи.

**Источник финансирования.** Если при исследовании или подготовке статьи была оказана финансовая поддержка, необходимо указать ее источник; если таковой не было, указывается ее отсутствие.

**Благодарность.** Если при выполнении работы или написании статьи авторам была оказана помощь, при этом те, кто ее оказывал, не входят в состав авторов статьи, в разделе «Благодарность» им может быть выражена благодарность с указанием их вклада в работу.

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Авторы должны обозначить статью как обзор литературы. Резюме обзорных статей не должно превышать 200 слов, в нем должна быть сформулирована цель обзора. Размер обзоров литературы не должен превышать 7000 слов и содержать более 90 литературных ссылок.

## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Письма редактору представляют собой короткие сообщения, содержащие значимые научные факты (предварительные результаты пилотных исследований, многоцентровых исследований и т. д.). Размер письма редактору не должен превышать 700 слов, допускаются 1 рисунок и 1 таблица.

## КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Сообщения о представляющих интерес, а также редких клинических наблюдениях, случаях. Размер клинического наблюдения не должен превышать 5000 слов, допускается до 3 рисунков, 3 таблиц. Резюме клинического наблюдения не должно превышать 200 слов, в нем должна быть сформулирована цель наблюдения.

## ФОРМАТИРОВАНИЕ ТЕКСТА ПУБЛИКАЦИИ

**Текст статьи** подается в формате Word, шрифт Times New Roman, размер 12. Применяется функция автоматической нумерации страниц.

**Все аббревиатуры** должны быть расшифрованы при первом упоминании. Не допускается после введения аббревиатуры использовать полное наименование. Целесообразно вводить аббревиатуры только для часто повторяющихся словосочетаний. Большое количество аббревиатур затрудняет чтение статьи.

**Физические величины** рекомендуется приводить в международной системе СИ. Не допускается использование даже общепринятых не в системе СИ величин, например, вместо «количество тромбоцитов 200 000 в мкл» должно быть  $200 \times 10^9/\text{л}$  и т. п. В десятичных дробях в качестве разделительного знака в русском варианте статьи употребляется запятая, в английском — точка. Названия микроорганизмов пишутся курсивом.

**Названия и символы генов** набираются курсивом, а названия их продуктов — с прописной буквы прямым шрифтом. Например: гены *fos*, *c-мус*, *ATM*; белки Fos, c-Мус, ATM.

**Математические формулы** и уравнения набираются в редакторах MS Word или MathType. Уравнения располагаются по центру строки.

**Таблицы** публикуются на русском и английском языках. Таблицы в тексте статьи размещаются при первом их упоминании. Не следует использовать опцию «обтекание текста». Таблицы снабжаются тематическими заголовками на русском и английском языках и нумеруются арабскими цифрами в порядке их упоминания в тексте. Название таблицы указывается сверху, над таблицей. Цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте. Все графы в таблицах должны иметь заголовки. Сокращение слов в таблицах не допускается. Все аббревиатуры должны быть расшифрованы в сносках к таблице.

**Все графики и рисунки** называются рисунками. Названия и подписи к рисункам и фотографиям группируются вместе и указываются в конце текста статьи на **русском и английском языках**. Каждый рисунок должен иметь заголовок и расшифровку всех сокращений. В подписях к графикам указываются обозначения по осям абсцисс и ординат, единицы измерения; пояснения приводятся по каждой кривой. В подписях к микрофотографиям указываются метод окраски и увеличение. Каждое изображение подается отдельным файлом. Ссылки на рисунки размещаются в тексте статьи, а их местоположение указывается на левом поле текста. Принимаются как черно-белые, так и цветные рисунки в хорошем разрешении (300 dpi) в форматах TIF и JPG.

## ОФОРМЛЕНИЕ СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ И ПОРЯДОК ЦИТИРОВАНИЯ

Ссылки на источники литературы в тексте указываются только в порядке цитирования и обозначаются цифрами в квадратных скобках. Нельзя ссылаться на диссертации и авторефераты диссертаций, следует ссылаться на статьи, опубликованные по теме диссертационных работ. Не следует ссылаться на неопубликованные данные. Должны быть ограничены (не более 3) ссылки на собственные работы (самоцитирование).

**Ссылка** должна приводиться на каждый указываемый факт или данные, которые не получены самими авторами в данном исследовании. Если приводится несколько фактов, то после каждого (а не в конце предложения) указывается источник литературы, в котором приведены эти данные. Ссылки на интернет-источники следует давать в виде полного адреса. Если возможно, следует указывать DOI.

**Список литературы** следует приводить в двух вариантах: на языке оригинала с русскоязычными источниками и тот же список литературы с переводом названий статей, журналов на английский язык, транслитерацией фамилий авторов на английском языке. Если у журнала нет названия на английском языке, приводится транслитерация оригинального названия, при этом в скобках указывается: (In Russian).

**Указываются первые 6 авторов** (требование РИНЦ) работы, если число авторов более 6, то пишется «и др.» (русскоязычные статьи) или «et al.» (для англоязычных статей).

### Применяется стиль цитирования Vancouver:

- после инициалов точки не ставятся;
- между авторами ставится запятая;
- перед названием журнала ставится точка;
- между названием журнала и годом его выпуска ставится точка;
- после URL точку не ставить, за исключением, когда ссылка заканчивается косой чертой;
- после DOI точка не ставится;
- при сокращении названия журнала точка не ставится;
- название журнала дается курсивом.

### Примеры:

#### Статьи на русском языке

Ягудина РИ, Молчанова НБ. Обзор рынка лекарственных препаратов, применяемых при лечении гемофилии в рамках федеральной программы «7 нозологий». *Фармакоэкономика: теория и практика*. 2016;4:109–14.

Yagudina RI, Molchanova NB. Market review of medicines used in the treatment of hemophilia under the federal program “7 nosologies”. *Pharmacoeconomics: theory and practice*. 2016;4:109–14.

#### Монографии

Андреев ЮН. Многоликая гемофилия. Ньюдиамед. Москва; 2006. 232 с.

Andreev YuN. Many-faced hemophilia. NewDiamed. Moscow. 2006. 232 p. (In Russian)

#### Статьи на английском языке

Langley AR, Stain AM, Chan A, Mclimont M, Chait S, Wu J, et al. Experience with central venous access devices (CVADs) in the Canadian hemophilia primary prophylaxis study (CHPS). *Haemophilia*. 2015;21:469–76. doi:10.1038/leu.2013.176



ISSN 0234-5730



9 770234 573007