

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

КАФЕДРА ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ И ГЕМАТОЛОГИИ

Н.Н. КЛИМКОВИЧ

**ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ
БОЛЕЗНЕЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ**

Учебно-методическое пособие

Минск БелМАПО

2018

УДК 616.15-07-08-053.2(075.9)

ББК 54.11я73

К 49

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
НМС Белорусской медицинской академии последипломного образования
протокол № 7 от 25. 09. 2018 г

Автор:

Климкович Н.Н., заведующий кафедрой детской онкологии и гематологии
БелМАПО доктор медицинских наук, доцент,

Рецензенты:

Кривенко С.И., заместитель директора по науке ГУ «МНПЦ хирургии,
трансплантологии и гематологии», доктор медицинских наук, доцент

Углова Т.А., заведующий лабораторией трансфузиологии ГУ «Республикан-
ский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммуно-
логии», кандидат медицинских наук, доцент

Климкович Н.Н.

К 49

Диагностика и терапия болезней крови у детей: учеб.-метод.
пособие /Н.Н. Климкович. – Минск: БелМАПО, 2018. – 220 с.

ISBN 978-985-584-282-9

В пособии представлены актуальные теоретические и практические аспекты болезней крови у детей. Даны современные представления о классификации и патогенетических механизмах основных гематологических заболеваний, встречающихся в детском возрасте. Обсуждены методы диагностики и терапии болезней крови у детей с акцентом на иммунные и молекулярно-генетические технологии

Предназначено для гематологов, педиатров лечебно-профилактических учреждений, студентов медицинских вузов, слушателей курсов последипломного образования врачей.

УДК 616.15-07-08-053.2(075.9)

ББК 54.11я73

ISBN 978-985-584-282-9

© Климкович Н.Н., 2018

© Оформление БелМАПО, 2018

Обозначения и сокращения

АА	–	апластическая анемия
АИГА	–	аутоиммунная гемолитическая анемия
АЛГ	–	антилимфоцитарный глобулин
АТГ	–	антитимоцитарный глобулин
АФС	–	антифосфолипидный синдром
АХЗ	–	анемия хронического заболевания
ВВИГ	–	внутривенный иммуноглобулин
ГА	–	гемолитическая анемия
ГСК	–	глюкокортикостероиды
ЖДА	–	железодефицитная анемия
ИСТ	–	иммуносупрессивная терапия
ИТ	–	иммунная тромбоцитопения
КМ	–	костный мозг
ЛДЖ	–	латентный дефицит железа
МДС	–	миелодиспластические синдромы
МНО	–	международное нормализованное отношение
МОБ	–	минимальная остаточная болезнь
НПВП	–	нестероидные противовоспалительные препараты
ОЛ	–	острый лейкоз
ОЛЛ	–	острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ	–	острый миелоидный лейкоз
ПАА	–	приобретенная апластическая анемия
ПХТ	–	полихимиотерапия
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
СФ	–	сывороточный ферритин
ТГСК	–	трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ТГФК	–	тетрагидрофолиевая кислота
ФДА	–	фолиеводефицитная анемия
ФК	–	фолиевая кислота
ХМЛ	–	хронический миелолейкоз
CD	–	кластер дифференцировки
CsA	–	циклоспорин А
CSF	–	колониестимулирующий фактор
ЕРО	–	эритропоэтин
F	–	фактор свертывания крови
FISH	–	флуоресцентная гибридизация in situ
IFN	–	интерферон
IL	–	интерлейкин
MCH	–	среднее содержание гемоглобина в эритроците
MCV	–	средний объем эритроцитов
MLPA	–	мультиплексная амплификация лигазносвязанных проб
NK	–	натуральные (естественные) киллеры
RDW	–	распределение эритроцитов по объему
Rtф	–	трансферриновый рецептор
TGF	–	трансформирующий ростовой фактор
TNF	–	фактор некроза опухоли
VEGT	–	фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

В структуре социально значимых заболеваний патология кроветворения занимает одно из ведущих мест среди причин смертности и утраты важных функций с формированием ограничения жизнедеятельности. Вместе с тем, клиническая гематология очень тесно связана с такими фундаментальными дисциплинами, как физиология, патофизиология, иммунология, цитогенетика, молекулярная биология. Современный диагноз болезни крови, первоначально опиравшийся на клинические симптомы и изменения в составе периферической крови, перешел в разряд диагноза, требующего высокотехнологичной лабораторной диагностики. С развитием науки и технологий, медицина в целом и онкогематология в частности, столкнулись с необходимостью коррекции подготовки врачей-специалистов. Накопленные знания и постоянное появление новых данных в области гематологии, онкологии и смежных дисциплин, таких как генетика, молекулярная биология, иммунология, ядерная медицина требуют особого отношения и к обучению врачей-специалистов. На сегодняшний день мировым трендом в здравоохранении является персонализированный подход к лечению, который получил свое развитие благодаря достижениям молекулярной биологии и технологиям прочтения генома человека. Для достижения оказания эффективной медицинской помощи пациентам с заболеваниями крови необходимо обучение новым информативным методам ранней диагностики с использованием иммунной и молекулярной базы, поддерживающей и восстановительной терапии пациентов с заболеваниями крови в соответствии с современным отечественным и мировым уровнем. С учетом всего этого в предлагаемом пособии изложены сведения о природе патологического кроветворения при основных заболеваниях крови, представлена диагностическая ценность современных лабораторных методов и стандарты лечения в соответствии с актуальными на сегодняшний день международными рекомендациями.

От автора

Глава 1

АНЕМИИ

Анемия характеризуется как патологическое состояние, связанное со снижением концентрации гемоглобина и/или количества эритроцитов в единице объема крови. Анемия может являться как самостоятельным заболеванием, так и сопутствующим синдромом многих внутренних болезней, инфекционных и онкологических заболеваний. Возникновение анемии может быть связано с акселерацией, пубертатным периодом, гормональными нарушениями, характером питания, заболеваниями желудочно - кишечного тракта, печени, почек, ферментопатиями, аутоиммунными состояниями, оперативным вмешательством и другими факторами. Коварность дефицитных анемий заключается в том, что, развиваясь исподволь, они долго не привлекают к себе внимания: постепенно появляющиеся отклонения относят к особенностям ребенка. Это может способствовать развитию серьезной болезни, требующей длительного лечения.

Структура анемий детского возраста представлена большим разнообразием, и в клинической практике целесообразно использовать систематизацию анемий по этиопатогенетическому принципу:

I. Анемии, обусловленные нарушением образования гемоглобина и эритроцитов вследствие дефицита гемопоэтических факторов (дефицитные анемии)

1. Железодефицитные анемии
2. Витамин В6-дефицитные анемии
3. Витамин С –дефицитные анемии
4. Белководефицитные анемии
5. Фолиеводефицитные анемии
6. Витамин В12-дефицитные анемии

II. Анемии, обусловленные нарушением образования гемоглобина вследствие дефекта синтеза гема (порфирии)

III. Анемии, обусловленные повышенным лизисом эритроцитов (гемолитические анемии)

1. Наследственные и врожденные гемолитические анемии:

а) Мембранопатии: связанные с нарушением белковых компонентов (микросфероцитоз, эллиптоцитоз, стоматоцитоз, пиропойкилоцитоз); связанные с нарушением липидного бислоя (акантоцитоз, дефицит активности ацетилхолинэстеразы).

б) Ферментопатии: нарушение активности ферментов пентозофосфатного цикла; нарушение активности ферментов гликолиза; нарушение обмена глутатиона; нарушение активности ферментов, участвующих в использовании АТФ.

в) Гемоглобинопатии: нарушение структуры и синтеза гемоглобина; нарушение синтеза цепей глобина; нарушение структуры цепей глобина.

2. Приобретенные гемолитические анемии:

а) Иммунные: трансиммунные; изоиммунные; гетероиммунные; аутоиммунные: с неполными тепловыми агглютинидами, с полными холодowymi агглютинидами, с двухфазными гемолизинами, с тепловыми и кислотными гемолизинами.

б) Неиммунные (механическое повреждение эритроцитов; нарушение структуры мембраны эритроцитов в результате соматических мутаций; химическое повреждение эритроцитов; дефицит витамина E; разрушение эритроцитов внутриклеточными паразитами).

в) Вторичные.

IV. Анемии, обусловленные угнетением продукции предшественников гемопоэза (апластические анемии)

1. Врожденные и наследственные

а) обусловленные нарушением клеточной линии эритропоэза - апластическая анемия Блекфана – Даймонда, синдром Блекфана – Даймонда;

б) обусловленные нарушением всех линий гемопоэза - апластическая анемия Фанкони; врожденный дискератоз; синдром Швахмана-Даймонда; рети-

кулярный дисгенез; амегакариоцитарная тромбоцитопения; семейные апластические анемии

2. *Приобретенные*: идиопатические, вторичные (облучение, токсическое воздействие лекарственных препаратов и химических веществ и т.п.).

V. Анемии, обусловленные нарушением процессов деления ядер и внутрикостномозговым разрушением эритрокариоцитов

Врожденные и наследственные дизэритропоэтические анемии (I – IV тип)

Приобретенные дизэритропоэтические анемии

VI. Анемии, обусловленные кровопотерей

Острая постгеморрагическая анемия

Хроническая постгеморрагическая анемия

VII. Анемии, обусловленные инфекцией и воспалением

VIII. Анемии при хронических болезнях (диффузные заболевания соединительной ткани, болезни почек, эндокринная патология и др.)

1.1 МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА АНЕМИЙ

Молекулярная диагностика анемий осуществляется в рамках диагностики наследственных заболеваний системы кроветворения, для чего чаще всего применяются методы амплификации с помощью ПЦР участков генов, в которых могут возникать клинически значимые мутации. Практически весь спектр анемий предполагает использование молекулярно-генетических методов диагностики: нарушение обмена железа и порфиринов, талассемии, гемоглобинопатии, врожденные и наследственные апластические анемии. Достижения в области изучения биологии метаболизма железа и его регуляции значительно расширили наши знания о заболеваниях, связанных с нарушением его обмена. Генетически обусловленные нарушения обмена железа могут сопровождаться как перегрузкой железом, так и его дефицитом. В таблице 1 представлены заболевания, сопровождающиеся перегрузкой железом, который развивается в результате генетически обусловленных дефектов белков, участвующих в абсорбции, транспорте, утилизации или хранении железа в

организме человека. Чаще всего это наследственные гемохроматозы, но вместе с тем, подобные заболевания могут сопровождаться анемией различной степени выраженности. Ген HFE (HLA-H) расположен на 6 хромосоме человека и кодирует белок, строение которого гомологично строению молекулы системы МНС (major histocompatibility complex) класса I. Точечные мутации гена HFE приводят к перегрузке организма железом, в результате чего развивается заболевание, известное как наследственный гемохроматоз. Наиболее тяжелые формы гемохроматоза развиваются при гомозиготном состоянии гена по мутации C282G. В том случае, если болезнь у гетерозигот все же развивается, то очень часто вторая копия гена несет мутацию H63D. В итоге до 90% пациентов с типичным фенотипом врожденного гемохроматоза являются гомозиготными по мутантному C282Y, меньшая часть больных - смешанными гетерозиготами (C282Y/H63D), а болезнь передается по наследству по аутосомно-рецессивному принципу. Мажорные мутации C282Y и H63D меняют сайты узнавания рестриктаз, поэтому для их анализа чаще всего используют ПЦР-амплификацию с последующим гидролизом ампликоном соответствующими рестриктазами.

В течение последнего десятилетия была описана новая причина наследственной железодефицитной анемии под названием железодефицитная железорезистентная анемия, которая возникает в результате мутаций в гене TMPRSS6 (картирование на хромосоме 22q12-q13), кодирующем фермент матриптазу (Matriptase-2). Мутация на уровне гена матриптазы (TMPRSS6) приводит к избыточной продукции гепсидина и замедлению поступления железа из энтероцита в плазму крови.

В диагностике талассемий для определения тяжести дисбаланса цепи глобина перед эрой ДНК использовался исключительно анализ синтеза цепи глобина, введенный более 30 лет назад. В настоящее время он остается чувствительным диагностическим инструментом, но ограниченным для определения некоторых сложных или атипичных форм талассемии.

Таблица 1 - Заболевания вследствие нарушения метаболизма железа

Дефект	OMIM №	Фенотип	Наследование	Выявлено у человека	Модель на животных
Нарушение абсорбции железа					
IRIDA Железорезистентная железодефицитная анемия (дефект Tmprss6)	#206200	Микроцитарная гипохромная анемия	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Дефицит гекфестина		Микроцитарная гипохромная анемия		Нет	Да
Нарушение транспорта/поступления железа					
Атрансферринемия	#209300	Микроцитарная гипохромная анемия Перегрузка железом	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Дефект <i>DMT1</i>	#206100	Микроцитарная гипохромная анемия Перегрузка железом	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Дефект <i>STEAP3/TSAP6</i>	#615234	Микроцитарная гипохромная анемия	Аутосомно-рецессивное	1 семья	Да
Гомозиготный дефект рецептора Tfr1		Нежизнеспособный		Нет	Да
Дефект <i>Sec1511</i>		Микроцитарная гипохромная анемия		Нет	Да
Дефект <i>ATP4a</i>		Микроцитарная гипохромная анемия		Нет	Да
Дефицит гастрина		Микроцитарная гипохромная анемия		Нет	Да
Нарушение рециркуляции железа					
Ацерулоплазмения	#604290	Нормоцитарная нормохромная анемия, диабет, нейропатия	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Нарушение абсорбции и рециркуляции железа					
Наследственный гемохроматоз тип 1 (дефект HFE)	#235200	Слабость, сонливость, артропатия, пигментация кожи, поражение печени (отложение железа в гепатоцитах с развитием фиброза, цирроза), сахарный диабет, эндокринопатия, кардиомиопатия, гипогонадотропный гипогонадизм; Hb – в норме или несколько повышен, средний возраст – 50–70 лет	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Наследственный гемохроматоз тип 2A (дефект HJV)	#602390	Аналогичны типу 1, более раннее начало (< 30 лет, средний возраст – 10 лет), преобладают кардиомиопатия и гипогонадизм	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Наследственный гемохроматоз тип 2B (дефект HAMP)	#613313	Аналогичны типу 1, более раннее начало (< 30 лет, средний возраст 10 лет), преобладают кардиомиопатия и гипогонадизм	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Наследственный гемохроматоз тип 3 (дефект TFR2)	#604250	Аналогичны типу 1	Аутосомно-рецессивное	Да	Да
Наследственный гемохроматоз тип 4 (болезнь ферропортина)	#606069	Часто гипохромная микроцитарная анемия 1-й ст., редко – Hb в норме. Относительно типа 1 менее выражена слабость, сонливость, артропатия, пигментация кожи, поражение печени (чаще в купферовских клетках с развитием фиброза; реже – в гепатоцитах с развитием фиброза, цирроза), сахарный диабет, эндокринопатия, кардиомиопатия, гипогонадотропный гипогонадизм	Аутосомно-доминантное	Да	Да
Наследственный гемохроматоз тип 5 (дефект гена <i>FTH1</i>)	#615517	Незначительная слабость, пигментация кожи, поражение печени (отложение железа больше в гепатоцитах и меньше в купферовских клетках), Hb в норме	Аутосомно-доминантное	1 семья	Да

Молекулярная диагностика при гемоглобинопатиях и талассемиях была применена на ранней стадии эры генетических исследований, и эти заболевания были использованы в качестве прототипа для разработки новых методов молекулярных аномалий. В настоящее время существует множество различных ПЦР-методик, используемых для диагностики известных мутаций гена глобина, а также других методов выявления неизвестных мутаций. На сегодняшний день известно более 200 мутаций β -талассемии, большинство из которых представляют собой однонуклеотидные замены, вставки или короткие делеции. Было выявлено несколько крупных делеций β -генов, и большинство из них могут быть диагностированы методом Gap-ПЦР (анализ разрывов). К счастью, в разных этнических группах преобладает ограниченное число точечных мутаций, поэтому для любого конкретного этнического региона изначально используется ПЦР-метод, предназначенный для одновременного обнаружения общей специфической мутации. При таком подходе можно выявить более 80% случаев заболевания большинства этнических групп. Для мутаций β -талассемии широко используется метод обратного точечного промокания, при котором усиленная ДНК гибридизируется с панелью мутационно-специфических зондов, закрепленных на нейлоновой полосе. Идентифицировать неизвестные мутации позволяет также прямое секвенирование. Альфа-талассемии в основном обусловлены делециями различной длины и их можно обнаружить преимущественно обратным точечным пятном и Gap-ПЦР. Усиление последовательностей в кластере генов α -глобина сложнее, чем в кластере генов β -глобина из-за значительной гомологии последовательностей в кластере генов α -глобина. Для неизвестной α -делеции в некоторых лабораториях до сих пор используется метод Саузерн-блоттинга, однако недавно был введен метод мультиплексной лигингозависимой амплификации зонда (MLPA). Этот метод в настоящее время имеет преимущество из-за его чувствительности и надежности.

Молекулярно-генетическая диагностика врожденных и наследственных апластических анемий является обязательным методом в современной гема-

чают явное доминантное наследование анемии у пробанда и одного из родителей или возникновение аномалий у рожденных друг за другом сиблингов; не исключена возможность аутосомно-рецессивного и сцепленного с X-хромосомой типов наследования. Также были обнаружены случайные аномалии при анемии Блекфена-Даймонда, как аномалии хромосом 1 и 16.

1.2. ДЕФИЦИТНЫЕ АНЕМИИ

Анемии, возникающие в результате недостаточного поступления в организм элементов, необходимых для качественного гемопоэза и синтеза гемоглобина, называются дефицитными. Термин «дефицитные анемии» объединяет прежде всего железодефицитную, В12-дефицитную и фолиеводефицитную анемии. Безусловным достижением современной гематологии является возможность точной диагностики и абсолютного излечения дефицитных анемий.

Железодефицитные анемии

Железодефицитная анемия (ЖДА) – патологическое состояние, обусловленное дефицитом железа в организме, характеризующееся трофическими расстройствами в тканях и дефектом синтеза гемоглобина. Железодефицитные состояния являются самой частой причиной развития анемии во всех группах населения в любой стране мира. Наиболее подвержены возникновению дефицита железа такие возрастные категории населения, как дети и женщины репродуктивного возраста. При прогрессировании дефицита железа в организме последовательно развиваются несколько стадий сидеропении: изначально уменьшается количество этого биометалла в резервном фонде (депо), гемоглобиновый фонд расходуется в последнюю очередь. Поэтому собственно ЖДА всегда предшествует латентный дефицит железа (ЛДЖ). Состояние ЛДЖ можно разделить на два этапа: прелатентный дефицит железа, когда расходуется резервный фонд и латентный (клинический) дефицит железа, когда присоединяется снижение количества железа тканевого и

транспортного фондов. При усугублении сидеропении в организме истощается гемоглобиновый фонд и развивается анемия (табл. 2).

Таблица 2 – Стадии формирования дефицита железа в организме

Стадии дефицита железа (развиваются последовательно)	Клинико – лабораторная характеристика
прелатентный дефицит железа	снижение концентрации ферритина в сыворотке крови
латентный дефицит железа	наличие сидеропенического синдрома снижение концентрации СФ, % НТФ
железодефицитная анемия	признаки ЛДЖ и наличие гипохромной микроцитарной анемии

В развитие дефицита железа вовлечены два основных механизма: уменьшение снабжения организма железом вследствие нарушения поступления или избытка потерь и повышенная потребность в железе. Достаточно редкими причинами дефицита железа в организме являются генетически детерминированные нарушения его метаболизма: атрансферринемии и дисрегуляция синтеза гепсидина.

В зависимости от этиопатогенеза и стадии сидеропении железодефицитные состояния классифицируются на два основных вида:

1. Латентные формы дефицита железа (прелатентный и латентный дефицит)
2. Железодефицитная анемия
 - Постгеморрагическая ЖДА
 - Алиментарная ЖДА
 - ЖДА при повышенной потребности в железе
 - ЖДА при недостаточном исходном уровне железа
 - ЖДА при резорбционной недостаточности
 - ЖДА при нарушении транспорта железа
 - Железодефицитная железорезистентная анемия

Клиническая картина ЖДА складывается из анемического синдрома, связанного с недостаточным обеспечением тканей кислородом, и

сидеропенического синдрома, который обусловлен, в первую очередь, значительным ухудшением энергетического метаболизма в результате недостатка железа, поэтому затрагивает практически все системы организма и ассоциируется с целым рядом негематологических проявлений: дистрофические изменения кожи и её придатков, атрофические изменения слизистых оболочек, извращение вкуса и запаха (*pica chlorotica*), мышечная гипотония, сидеропеническая дистрофия эндотелия сосудов, психо – неврологические нарушения (проявляются снижением умственных и познавательных способностей), периодический субфебрилитет, спленомегалия и снижение иммунологической реактивности.

В клинической практике железодефицитные состояния, как правило, выявляются при проведении плановых обследований или при контроле гемограммы во время инфекционно - воспалительного заболевания. В этом случае последовательность диагностического поиска можно условно представить в виде нескольких этапов: установление наличия анемического и/или сидеропенического синдрома, доказательство наличия анемии, доказательство железодефицитного характера анемии, установление причины ЖДА. Предположение о наличии дефицита железа возникает при обнаружении классических клинических признаков сидеропении, наличии в анамнезе эпизодов ЖДС, наличии хронических кровопотерь, хронических инфекционных заболеваний, заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Изменения в гемограмме при ЖДА характеризуются как гипохромная микроцитарная, гипер-, реже норморегенераторная, анемия. Однако, эритроцитарные индексы, MCV и MCH, отражают усредненные показатели всей популяции циркулирующих эритроцитов, поэтому на ранних этапах ЖДА морфологический анализ оказывается более достоверным. В последние годы, благодаря использованию нового поколения анализаторов проточной цитометрии, появилась возможность выявлять процент эритроцитов с недостаточной гемоглобинизацией. Среднее содержание гемоглобина в ретикулоците так же отражает степень инкорпорации железа для синтеза гемоглобина и

является ранним индикатором железодефицитного эритропоэза. Доказательством железодефицитного характера выявленной гипохромной микроцитарной анемии служат результаты лабораторного исследования метаболизма железа: снижение уровня сывороточного ферритина, процента насыщения трансферрина железом, повышение содержания растворимых рецепторов трансферрина. Пункция костного мозга для анализа миелограммы при лабораторном доказательстве железодефицитного характера анемии не требуется.

Обязательным этапом диагностического комплекса является выявление причины, вызвавшей ЖДА, хотя этот диагностический поиск не относится к доказательству собственно ЖДА и служит основой для вторичной профилактики. Методы установления причины дефицита железа в организме выбираются индивидуально в зависимости от данных анамнеза, возраста пациента и сопутствующей патологии.

Железодефицитные анемии нередко приходится дифференцировать от других гипохромных анемий, которые наблюдаются при хронических болезнях, острых инфекционных заболеваниях, талассемии и нарушениях синтеза или утилизации порфиринов (табл. 3).

Лечебная тактика при ЖДА должна основываться на точном знании характера и причин заболевания, носить патогенетический характер и следовать определенным принципам. Лечение препаратами железа длительное (минимум 12 недель) и складывается из 2 этапов: купирование анемии, проводимое до нормализации показателей гемоглобина (4-10 недель), и восполнение депо железа (8-16 недель), проводимое в объеме 50-60% суточной дозы первого этапа. В педиатрии суточная доза ферропрепарата для терапии *per os* рассчитывается по содержанию элементарного (ионизированного) железа в зависимости от степени тяжести анемии и возраста ребенка (табл. 4) и предлагается в 1 - 2 приема (без дробления лекарственной формы в виде капсулы и драже).

Таблица 3 - Основные дифференциально - диагностические признаки гипохромных анемий

Основные признаки	Вид анемии				
	ЖДА	АХБ	острые инфекционные анемии	порфирии	талассемии
Содержание СЖ	Снижение	Повышение	Норма	Норма	Повышение
ОЖСС	Повышение	Снижение	Норма	Норма	Снижение
Содержание СФ	Снижение	Повышение	Повышение	Норма	Повышение
Rt в ПК	Норма	Норма или снижение	Норма или повышение	Норма	Повышение
Мишеневидные эритроциты	Может быть	Может быть	Отсутствует	Отсутствует	Выражена
Базофильная пунктация Ег	Отсутствует	Имеется	Отсутствует	Отсутствует	Имеется
Количество сидеробластов и сидероцитов	Снижение	Повышено	Повышение	Повышение	Повышение
Непрямой билирубин	Норма	Норма	Норма	Норма	Часто повышение
Сидеропенический синдром	Имеется	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Эффект от ферротерапии	Имеется	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
RDW, %	Повышение	Норма	Норма	Повышение	Повышение
Rtф	Повышение	Норма	Норма	Норма	Норма

Таблица 4 - Расчет суточного количества железа для пероральной ферротерапии

Возраст	Степень тяжести ЖДА		
	Легкая	Средняя	Тяжелая
0 – 3 года	5 мг/кг/сут	5 – 7 мг/кг/сут	8 – 10 мг/кг/сут
дети старше 3 лет с массой тела до 50 кг	3 - 5 мг/кг/сут	5 мг/кг/сут	6 – 7 мг/кг/сут
дети с массой тела 50 кг и более	2 – 4 мг/кг/сут		

Выбор ферропрепарата для проведения терапии ЖДА зависит от требуемой суточной дозы железа, его содержания в единице препарата, лекар-

ственной формы, химической структуры, степени абсорбции железа. Лекарственные препараты, содержащие железо, различаются по химической структуре, способу введения, присутствию в их составе других компонентов.

Сегодня на фармацевтическом рынке страны имеется большой выбор препаратов железа, представленных монокомпонентными и комбинированными соединениями солей железа и препаратов на основе гидроксид-полимальтозного комплекса. Для решения задачи дифференцированного подбора препарата железа следует учитывать, что эффективность и переносимость ферротерапии зависит не только от соединения железа и суточной дозы препарата, но и от индивидуальной чувствительности. Процесс всасывания железа весьма трудоемкий, зависит от многих внутриклеточных и мембранных белковых структур, синтез которых генетически детерминирован. Поэтому нельзя заранее предугадать эффективность ферротерапии в каждом конкретном случае, препараты железа требуют индивидуального подбора. Также следует помнить, что биологические функции железа могут тормозиться в отсутствие целого ряда микронутриентов (особенно Zn, Mn, Cu, Mo, Cr, I, витаминов C, B₂, B₆). Поэтому, для проведения наиболее успешной и безопасной фармакотерапии железодефицитных состояний, следует рассмотреть как взаимодействия между этими микронутриентами, так и наиболее приемлемые фармацевтические формы железа. Несмотря на синергизм между микроэлементами на уровне физиологических систем и конкретных белков, существует также определённый фармакокинетический антагонизм между железом, цинком, медью, молибденом и марганцем. Железо, медь, магний ухудшают всасывание цинка. Молибден увеличивает потерю меди с мочой, а цинк может конкурировать с медью за всасывание. Из этих фармакокинетических антагонизмов следует, что наиболее приемлем совместный приём железа, меди и марганца (минимальный фармакокинетический антагонизм), а цинк и молибден следует принимать отдельно от железа, меди и марганца. При выборе препарата железа следует о наиболее приемлемых фармацевтических формах железа и других микроэлементах. Сульфаты

и прочие неорганические соединения железа, меди, марганца и других макро- и микроэлементов представляют собой первое поколение элементсодержащих препаратов. Более совершенные препараты основаны на органических соединениях (как правило, солях), обладающих более высокой усвояемостью и лучшей переносимостью. Препараты железа перорального введения более предпочтительны по сравнению с медикаментами парентерального введения. Терапевтический эффект от препаратов железа, назначаемых внутрь, наступает позже, чем при назначении парентерально, но побочные эффекты при назначении внутрь возникают существенно реже.

Парентеральное назначение препаратов железа возможно только после лабораторного доказательства железодефицитного характера анемии на основании низкого уровня СФ и по следующим показаниям: тяжелая степень ЖДА, заболевания желудочно – кишечного тракта, не позволяющие принимать препарат железа внутрь или сопровождающиеся нарушением абсорбции железа, неэффективность пероральной ферротерапии, проводимой в течение 4 недель. Расчет курсовой дозы парентерального железа проводится по формулам, указанным в фармакологической инструкции.

Лечение ЛДЖ проводится аналогично второму этапу терапии ЖДА при легкой степени анемии. Контролем эффективности является отсутствие сидеропенического синдрома и нормализация уровня сывороточного ферритина.

Абсолютными противопоказаниями к назначению ферропрепаратов являются острые инфекционные заболевания; заболевания, сопровождающиеся кумуляцией железа (гемохроматоз, наследственные и аутоиммунные гемолитические анемии), нарушением утилизации железа (сидеробластные анемии, α - и β -талассемия, анемия при отравлении свинцом) или костномозговой недостаточностью эритропоэза (апластические анемии).

Трансфузии эритроцитарной массы с заместительной целью при ЖДА проводятся только по витальным показаниям (угроза анемической комы, выраженная декомпенсация: одышка, нарушение гемодинамики, обмороки, угнетение сознания) и не зависят от концентрации гемоглобина.

Необходимым этапом лечения ЖДА является так же и устранение её причины, поскольку сохранение основного заболевания может повлечь за собой рецидив ЖДА. При невозможности радикальной терапии заболевания, явившегося причиной ЖДА, показано проведение вторичной специфической профилактики препаратами железа.

Витамин В12 дефицитные анемии

Витамин В12 - дефицитная анемия с мегалобластным типом эритропоэза, возникающим в результате дефицита витамина В12. Кроме мегалобластного эритропоэза отличительными чертами В12-дефицитной анемии являются высокая частота у пожилых пациентов, переменная (чаще трехростковая) цитопения в периферической крови, макроцитоз и гиперхромия эритроцитов, наличие симптомов неэффективного эритропоэза с внутрикостномозговым разрушением эритрокарицитов, изменения нервной системы по типу фуникулярного миелоза, частое сочетание с атрофическим гастритом.

Витамин В12 не синтезируется растениями, но продуцируется некоторыми видами плесневых грибов и многими микроорганизмами - обитателями корнеплодов и бобовых, и присутствует в мышцах и паренхиматозных тканях животных, питающихся этими растениями. Источником поступления витамина В12 в организм человека являются только продукты животного происхождения: печень, мясо, яйца, сыр, молоко. У человека кобаламины синтезируются в толстом кишечнике, но не абсорбируются. Ежедневная потеря цианкобаламина (1-4 мкг) в норме компенсируется его поступлением с пищей. Поскольку ежедневная потеря витамина В12 очень невелика по сравнению с запасами в организме, то в случае полного прекращения поступления в организм, его запасов достаточно на 2-3 года. Абсорбция витамина В12 в желудочно-кишечном тракте обеспечивается сложным механизмом, позволяющим усвоить чрезвычайно малое количество витамина из пищи, и включает высвобождение витамина из пищи, связывание с кобалофиллинами слюны, переваривание кобалофиллинов в проксимальных отделах тощей кишки

ферментами поджелудочной железы и передачу витамина В12 внутреннему фактору Кастла (ВФ), соединение комплекса «витамин В12-ВФ» с рецепторами подвздошной кишки, эндоцитоз и внутриклеточное связывание витамина В12 с транскобаламином II.

При развитии дефицита витамина В12 происходит нарушение синтеза жирных кислот и накопление метилмалоновой кислоты, с чем связана неврологическая симптоматика, нарушение синтеза ДНК в результате замедления S фазы митоза и накопление клеток в G1 периоде, что характеризуется мегалобластическим кроветворением, неэффективным эритропозом и разрушением эритрокариоцитов.

Возможные причины развития дефицита витамина В12 в организме:

I. Недостаточное поступление витамина В12

1. алиментарный дефицит

2. нарушение абсорбции

- ◆ недостаточность внутреннего фактора Кастла
 - пернициозная анемия
 - хирургические вмешательства на желудке (тотальная или частичная гастрэктомия, желудочный шунт)
 - действие едких веществ
- ◆ функциональная аномалия внутреннего фактора
 - биологическая конкуренция (избыточный рост бактерий в тонком кишечнике, анастомозы и фистулы, слепые петли и карманы, стриктуры, склеродермия, ахлоргидрия), гельминты
- ◆ нарушение всасывания
 - семейное избирательное нарушение всасывание вит. В12 (синдром Имерслунд-Гресбека) - лекарственно-индуцированное нарушение всасывание вит. В12
 - хронические заболевания поджелудочной железы
 - синдром Золингер-Эллисона
 - гемодиализ

- заболевания повздошной кишки (резекция и шунт подвздошной кишки, локальный энтерит)
- целиакия

II. Нарушение транспорта витамина В12

1. наследственный дефицит транскобаламина 2
2. транспортный дефицит транскобаламина 2
3. частичный дефицит транскобаламина 1

III. Нарушение метаболизма витамина В12

1. наследственные
 - дефицит аденозилкобаламина, метилмалонил СоА-мутаза, метилкобаламина комбинированный дефицит метилкобаламина и аденозилкобаламина
2. приобретенные
 - заболевания печени, белковая недостаточность(квашиоркор, маразм), лекарственно – обусловленные (аминосалициловая кислота, неомицин, этанол, контрацептивы, метформин, колхицин)

Витамин В12 - дефицитная анемия развивается постепенно и имеет три формы: скрытая, манифестная, анемическая. Критериями диагностики различных форм заболеваемости являются содержание витамина В12 в сыворотке крови и эритроцитах, морфология эритроцитов, содержание метилмалоновой кислоты. Скрытая форма характеризуется снижением уровня витамина В12 в сыворотке крови, повышением уровня метилмалоновой кислоты, нормальными показателями гемограммы. Манифестная форма проявляет себя снижением концентрации витамина В12 в сыворотке крови, повышением уровня и увеличением экскреции с мочой метилмалоновой кислоты, появлением мегалобластов в КМ, гиперсегментированных нейтрофилов и мегалоцитов в периферической крови. Анемическая форма диагностируется при наличии признаков манифестной формы и макроцитарной анемии, мегалоцитоза, умеренной нейтропении и тромбоцитопении, патоло-

гических тестов регенерации (тельца Жолли, кольца Кебота, базофильная пунктация).

Клиническая картина В12-дефицитной анемии характеризуется неврологическими симптомами (раздражительность, анорексия, беспокойство, плохой сон, атаксия, парестезия, гипорексия, появление патологических рефлексов, судорог), анемическим синдромом, атрофическими изменениями слизистых оболочек, диспептическими расстройствами, спленомегалией.

Лабораторная диагностика витамин В12-дефицитной анемии строится на установлении мегалобластной анемии и снижения содержания витамина В12 в сыворотке крови и эритроцитах. В гемограмме выявляется макроцитарная гипер- или нормохромная гипорегенераторная анемия, пойкилоцитоз, патологические включения эритроцитов, лейкопения, гиперсегментация ядер нейтрофилов, тромбоцитопения. Биохимический анализ крови характеризуется повышением билирубина за счет его непрямой фракции, СФ и ЛДГ. В миелограмме отмечается эритроидная гиперплазия со снижением количества зрелых эритроидных клеток и наличием мегалобластов. Специфическим тестом служит снижение уровня витамина В12 в сыворотке крови. Дефицит витамина В12 сопровождается значительным повышением содержания метилмалоновой кислоты и гомоцистеина в сыворотке крови, а так же их экскрецией с мочой.

С целью определения терапевтической и профилактической тактики при витамин В12-дефицитной анемии одним из этапов диагностики является поиск причины дефицита кобаламина (табл. 5, 6). Для этого применяются лабораторные и инструментальные методы диагностики: фиброгастродуоденоскопия, обследование на гельминтозы, антитела к внутреннему фактору Кастла, антитела к париетальным клеткам (чувствительный, но неспецифичный тест, обнаруживаются при хроническом гастрите, сахарном диабете и у 2 % здоровых людей), анализ кала на дисбактериоз, колоноскопия.

Таблица 5 - Лабораторная характеристика врожденного и приобретенного дефицита витамина В12

Форма дефицита витамина В12	желудок			тест Шиллинга		АТ в крови к		Сопутствующие признаки
	Гистология	ВФ	НСI	без ВФ	при ВФ	ВФ	париетальным клеткам	
Врожденная	норма	нет	норма	↓	норма	-	-	нет
Ювенильная	Атрофия	нет	↓	↓	норма	+	+	СКВ, ↓IgA, эндокринопатии
Ювенильная анемия с эндокринопатиями или ↓ IgA	атрофия	нет	↓	↓	норма	-	+	Гипотироз, СД тип I, ↓IgA, болезнь Аддисона, патология яичников
Синдром Иммерслунга – Гресбека	норма	+	норма	↓	↓	доброкачественная протеинурия, аминокацидурия		
Генерализованная мальабсорбция	норма	+	норма	↓	↓	Синдром мальабсорбции, болезнь Крона, лимфома, резекция желудка, подвздошной кишки		

Таблица 6 - Признаки врожденных нарушений метаболизма кобаламина

Причина	Вит.В12 в сыворотке	Клинические и биохимические признаки
Мальабсорбция пищевого кобаламина	↓	Патология нервной системы с/без мегалобластной анемии, умеренное повышение метилмалоновой кислоты/гомоцистеина
Дефицит ВФ Кастла	↓	Мегалобластная анемия, отставание в развитии, умеренное повышение метилмалоновой кислоты/гомоцистеина
С-м Иммерслунг-Гресбека	↓	Мегалобластная анемия, протеинурия, отставание в развитии, повышение метилмалоновой кислоты/гомоцистеина
Дефицит транскобаламина I	↓	Нет проявлений, нет повышения метилмалоновой кислоты/гомоцистеина
Дефицит транскобаламина II	Норма	Патология нервной системы с/без мегалобластной анемии, нарушение роста, умеренное повышение метилмалоновой кислоты/гомоцистеина
Внутриклеточная патология транскобаламина	Норма	Тяжелая пернициозная анемия, повышение метилмалоновой кислоты/гомоцистеина

Специфическая терапия витамин В12-дефицитной анемии проводится в три этапа: интенсивный, закрепляющий и поддерживающий. В интенсив-

ный (основной) этап препараты витамина В12 (цианкобаламин, оксикобаламин, гидрооксицианокобаламин) назначаются в дозе насыщения детям до года 5 мкг/кг в сутки, детям в возрасте от 1 года до 10 лет 200 - 400 мкг в сутки, старше 10 лет 500 мкг в сутки ежедневно парентерально 4 недели. При наличии признаков гематологической ремиссии (нормализация показателей периферической крови, уровня витамина В12 в сыворотке крови) необходимо перейти на закрепляющий этап. Закрепляющий этап предполагает введение парентерально препаратов витамина В12 детям до года 100 мкг, детям от года до 10 лет 200 - 500 мкг, старше 10 лет 500 мкг 1 раз в неделю в течение 12 недель. Поддерживающий этап заключается в введении препаратов витамина В12 парентерально 2 раза в месяц в течение первых 3-х месяцев, 1 раз в месяц последующие 3 месяца (суточные дозы аналогичны таковым при закрепляющем этапе). В дальнейшем при невозможности устранить причину развития анемии противорецидивные курсы лечения витамином В12 проводятся 2 раза в год курсами по 15 инъекций (ежедневно или через день).

В некоторых случаях на фоне лечения витамином В12 и активизации эритропоэза может проявиться дефицит железа, который препятствует полной нормализации показателей крови и требует стандартного лечения препаратами железа.

Фолиеводефицитные анемии

Фолиеводефицитная анемия (ФДА) - анемия обусловленная дефицитом количества фолатов в организме (в сыворотке крови и эритроците). В организме ФК не вырабатывается, и запасы фолатов у человека невелики (5-10 мг), а их суточная потеря 100-200 мкг, поэтому полное прекращение поступления фолатов с продуктами питания приводит к их дефициту через 1 - 2 месяца. Минимальная ежедневная потребность в фолатах составляет 50-100 мкг. Фолаты синтезируются растениями и микроорганизмами. Наибольшее количество ФК содержится в листовых овощах (бобовые, салат, шпинат), фруктах, грибах, дрожжах, животных белках (печень, почки). Фолиевая кис-

лота обладает хорошей биодоступностью, однако в связи с термолабильностью 50-95 % ФК разрушается в процессе приготовления пищи. Абсорбция фолатов происходит преимущественно в тощей кишке. При этом полиглутаматы конвертируются в моноглутаматы, которые абсорбируются диффузией или активным транспортом. Основным депо ФК является печень, где ФК находится в неактивном состоянии (в виде тетрагидрофолиевой кислоты) и переходит в активную форму по мере метаболических потребностей клеток. Все клетки организма, в том числе КМ, получают ФК из плазмы в форме метил-тетрагидрофолиевую кислоту (ТГФК). При переходе метил-ТГФК в ТГФК необходим витамин В12, участвующий в метилировании метионина из гомоцистеина. Полиглутамат 5,10-метилен-ТГФК, который является метаболитом полиглутамата ТГФК, необходим в качестве кофактора для реакций синтеза тимина монофосфата. При дефиците данного кофактора нарушается метаболизм тимина, что ведет к прерыванию четырехступенчатого синтеза ДНК. Во время синтеза тимидиновой кислоты ФК окисляет функционально неактивный полиглутамат дигидрофолиевой кислоты. Для регенерации активной тетрафолиевой кислоты необходима редуктаза дигидрофолиевой кислоты. Препараты, угнетающие данный фермент (метотрексат и др.), ингибируют тем самым все реакции, при которых ФК участвует как коэнзим, тормозя заключительный этап синтеза ДНК. Таким образом, при дефиците или снижении активности фолиевой кислоты нарушается синтез ДНК, РНК и белков, что ведет к изменению процессов дифференцировки клеток всех линий кроветворения.

Возникновение ФДА может быть обусловлено различными факторами, связанными как с физиологическими, так и социальными причинами:

I. Неадекватное поступление ФК

- Пристрастие в питании, низкий экономический уровень
- Способы приготовления пищи (термическая обработка)
- Вскармливание козьим молоком
- Нарушение питания

- Специальные диеты (фенилкетонурия, болезнь кленового сиропа)
- Недоношенность
- Состояние после ТГСК

II. Нарушение абсорбции ФК

- Врожденная изолированная мальабсорбция фолатов
- Приобретенная (идиопатическая стеаторея, тропическая спру, полная или частичная гастроэктомия, резекция тощей кишки, воспаление повздошной кишки, болезнь Уиппла, лимфома кишечника, множественные дивертикулы тонкой кишки, лекарственные препараты (антибиотики широкого спектра действия, пероральные контрацептивы, циклосерин, метформин, этанол, барбитураты, примидин, дифенилгидантоин, пищевые аминокислоты: метионин, глицин,), состояние после ТКМ)

III. Повышенная потребность ФК

- Усиленный рост (недоношенность, беременность, период лактации)
- Хронический гемолиз, особенно в сочетании с неэффективным эритропоэзом
- Дизэритропоэтические анемии
- Злокачественные заболевания крови (лимфомы, лейкозы)
- Гиперметаболические состояния (инфекции, тиреотоксикоз)
- Обширные поражения кожи (дерматиты)
- Цирроз печени
- Состояние после ТГСК

IV. Нарушение метаболизма ФК

А. Врожденное

- Дефицит метилтетрагидрофолат редуктазы
- Недостаточность глутамат форминотрансферазы
- Функциональная недостаточность 3-метилтетрагидрофолат гомоцистеин метилтрансферазы
- Недостаточность дегидрофолат редуктазы
- Дефицит метилтетрафолат циклогидролазы
- Первичная недостаточность метилтетрагидрофолат гомоцистеин метилтрансферазы

Б. Приобретенное

- Лекарственные препараты: антогонисты фолатов - антиметаболиты (пириметамин, триметоприм, метотрексат, пентамидин)
- Дефицит витамина В12
- Алкоголизм
- Патология печени

V. Повышенная экскреция

- регулярный диализ
- заболевания сердца
- заболевания печени
- дефицит витамина В12

ФДА также имеет три формы: скрытая, манифестная, анемическая. Критериями диагностики различных форм заболеваемости служат концентрация ФК в сыворотке крови и эритроцитах, морфология эритроцитов крови. Скрытая форма устанавливается при снижении уровня ФК в сыворотке крови, нормальном содержании ФК в эритроцитах и отсутствии патологических изменений в клетках крови. Манифестная форма характеризуется снижением концентрации ФК в сыворотке крови и эритроцитах, наличием мегалоцитов в крови и мегалобластов в КМ. Анемическая форма диагностируется при сочетании низкого уровня ФК в сыворотке и эритроцитах, макроцитарной анемии, гиперсегментации ядер нейтрофилов, умеренной нейтропении, тромбоцитопении, макроформ клеток всех линий гемопоэза, патологических включений в эритроцитах (тельца Жолли, кольца Кебота, базофильная пунктация).

При ФДА в процесс нарушения пролиферации вовлекаются все делящиеся клетки, однако наиболее чувствительными оказываются активно пролиферирующие клеточные системы, такие как костный мозг и эпителий. Поэтому клиническая картина складывается из гематологических и дистрофических синдромов. Анемический синдром неспецифичен, характеризуется слабостью, потерей аппетита, бледностью, утомляемостью, головокружением и.п. Помимо общих симптомов анемии возможен лимонный оттенок кожи -

сочетание бледности и желтухи, которая является следствием неэффективного эритропоэза (внутрикостномозгового распада гемоглобинсодержащих мегалобластов). Нарушение деления эпителиальных клеток при мегалобластных анемиях приводит к дистрофическим изменениям на слизистых оболочках языка, полости рта, пищевода, желудка и кишечника. При этом слущивающиеся эпителиальные клетки восстанавливаются медленно, что приводит к воспалительно-атрофическим изменениям слизистой. Клинически это проявляется в виде глоссита, стоматита, эзофагита, гастрита и энтерита. Для типичной картины глоссита Хантера свойственно появление ярко-красных участков воспаления на кончике и по краю языка, иногда захватывающих всю его поверхность («лакированный» язык). Возможны афтозные высыпания и трещины на языке. Подобные изменения могут распространяться на десны, слизистую щек, мягкое небо, глотку и пищевод. Прием пищи и лекарственных средств сопровождается ощущением жжения и болью. Иногда пациенты жалуются на чувство тяжести в эпигастральной области, потерю аппетита и диспептические расстройства. Умеренная спленомегалия наблюдается у трети пациентов и является результатом экстрамедуллярного гемопоэза. При длительно существующем дефиците фолиевой кислоты у детей возможно отставание в физическом развитии.

Лабораторная диагностика ФДА основывается на обнаружении признаков мегалобластоидного гемопоэза и определении содержания фолиевой кислоты в сыворотке крови и эритроцитах. Гемограмма характеризуется, в первую очередь, анемией макроцитарной гипер- или нормохромной гипорегенераторной, сопровождающейся наличием мегалоцитов, пойкилоцитозом и патологическими включениями эритроцитов. Анемия сочетается с лейкопенией, наличием гиперсегментации ядер нейтрофилов, тромбоцитопенией. Цитометрия указывает на макроформы эритроцитов, нейтрофилов и тромбоцитов). Изменения тестов биохимического анализа крови неспецифичны и могут характеризоваться повышением общего количества билирубина за счет непрямой его фракции,

СФ. Миелограмма является необходимым диагностическим компонентом при мегалобластных анемиях. Костный мозг при фолиеводefицитных анемиях характеризуется эритроидной гиперплазией со снижением количества зрелых эритроидных клеток и наличием мегалобластов в высоком проценте. Определение низкого уровня ФК в сыворотке крови и эритроцитах указывает на причину мегалобластной анемии и является основой для диагноза фолиеводefицитной анемии. Истинный дефицит фолиевой кислоты демонстрирует только её содержание в эритроцитах, низкое количество фолиевой кислоты в сыворотке крови указывает только на негативный баланс фолатов. Ранними диагностическими критериями нарушения синтеза нуклеиновых кислот служат повышение уровня метилмалоновой кислоты и гомоцистеина в сыворотке крови, а также их экскреция с мочой. При дефиците фолатов наиболее чувствительным тестом служит количество гомоцистеина, а содержание метилмалоновой кислоты повышается незначительно.

Для успешной терапии и предотвращения рецидива ФДА необходимо установление её причины, для чего показаны лабораторные и инструментальные методы диагностики, выбираемые индивидуально после тщательного сбора анамнеза: фиброгастродуоденоскопия, колоноскопия, УЗИ органов брюшной полости, исследование метаболитов фолиевой кислоты и т.п.

Специфическая терапия ФДА предполагает замещение дефицита фолатов в организме. Для этого назначаются препараты фолиевой кислоты внутрь в возрастных дозировках: детям до 1 года 0,5 мг/кг в сутки в течение 20 дней; детям 1- 10 лет 4-6 мг/сутки в течение 3 недель и детям старше 10 лет 8-10 мг/сутки в течение 3 недель. При нарушении абсорбционной функции кишечника доза фолиевой кислоты может быть увеличена до 15 мг/сутки. С целью первичной профилактики фолиевая кислота в дозе 1-2 мг/сутки курсами по 20-30 дней назначается недоношенным детям, детям с низкой массой тела

при рождении, детям, страдающим хроническими воспалительными заболеваниями, заболеваниями кишечника с синдромом мальабсорбции.

1.3. ГЕМОЛИТИЧЕСКИЕ АНЕМИИ

Гемолитические анемии (ГА) - заболевания, характеризующиеся преждевременным повышенным распадом эритроцитов. Основные клинические проявления ГА складываются из анемического синдрома и желтухи - окрашивания кожных покровов и склер в желтый цвет в результате отложения в них желчных пигментов. При ГА повышается уровень неконъюгированного билирубина вследствие разрушения эритроцитов и метаболизма протопорфиринов до билирубина. Гемолиз является причиной выхода из клетки гемоглобина, который затем распадается на глобин, железо и протопорфирин. При внутрисосудистом гемолизе высвобожденный из эритроцитов гемоглобин частично выводится с мочой (гемоглобинурия, гемосидеринурия), частично связывается с гаптоглобином плазмы и транспортируется к паренхиматозным клеткам печени. Несвязанный билирубин так же транспортируется в печень. Образовавшийся в печени или транспортированный туда билирубин вступает в реакцию конъюгации с глюкуроновой кислотой и в связанном виде способен выделяться в желчь и поступать в кишечник. Здоровая печень в состоянии связать излишний билирубин, увеличивая скорость конъюгации в 6 раз по сравнению с физиологической. В кишечнике билирубин превращается в уробилиноген, который либо подвергается обратному всасыванию и выводится с мочой (конъюгированный (прямой) билирубин водорастворим, поэтому любой его избыток легко экскретируется), либо транспортируется по кишечнику и выводится в виде стеркобилиногена

По месту разрушения эритроцитов гемолиз подразделяется на внутрисосудистый, внутриклеточный и смешанный (таблица 7).

Таблица 7- Виды и клинические признаки гемолиза

Вид гемолиза	Признаки
внутриклеточный	Спленомегалия, гепатомегалия, гипербилирубинемия
внутрисосудистый	Гемоглобинемия, гемоглобинурия, гемосидеринурия, метгемоглобинемия, ДВС- синдром
Смешанный	сочетание признаков внутриклеточного и внутрисосудистого гемолиза

Следствием острого массивного разрушения эритроцитов является гемолитический криз, представляющий собой резкое усиление процесса гемолиза на фоне действия провокационного агента (инфекция, холод, лекарственные средства, химические вещества, гипоксия и др.). По генезу и течению различают несколько видов гемолитических кризов:

- гемолитический криз клинически и лабораторно характеризуется анемией и соответствующими симптомами (слабость, бледность, головокружение, сонливость, тахикардия, гемодинамические нарушения и т.п.), гипербилирубинемией и желтухой, гиперретикулоцитозом;

- арегенераторный криз является следствием дефекта компенсаторно-адаптационных возможностей гемопоэза и нарушением регенерации эритроидной линии КМ, чаще возникает при инфекции, вызванной парвовирусом В19, клинически проявляется анемическим синдромом, иктеричностью склер и слизистых, желтушностью кожных покровов, может быть гепато-, спленомегалия; количество ретикулоцитов в периферической крови резко снижено;

- секвестрационный криз развивается редко, в его основе лежит внутрисосудистый гемолиз, преимущественным местом разрушения эритроцитов являются сосуды селезенки, реже – печени. В клинической картине наряду с симптомами гемолиза (желтуха, анемический синдром) появляются абдоминальные боли (как правило, в области селезенки и печени), тошнота, сплено-, гепатомегалия, гиповолемический шок;

- вазоокклюзионный криз часто отмечается при качественных гемоглобинопатиях, его провоцируют такие факторы, как дегидратация, инфекции, переохлаждение. Клиническая картина характеризуется желтухой, анемическим и болевым синдромами. Наиболее характерен болевой синдром костно–мышечной (оссалгии, миалгии, артралгии) и абдоминальной локализации. Клинические проявления развиваются в результате окклюзии сосудов брыжейки, внутренних органов и инфаркта селезенки, печени, лимфатических узлов, мозга и др.

КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АНЕМИЙ

I. Неиммунные ГА

1. Наследственные и врожденные:

а) Мембранопатии, связанные с нарушением белковых компонентов:
микросфероцитоз, эллиптоцитоз, стоматоцитоз, пиропойкилоцитоз

б) Мембранопатии, связанные с нарушением липидного бислоя:
акантоцитоз, дефицит активности ацетилхолинэстеразы

в) Ферментопатии (энзимопатии):
нарушение активности ферментов пентозофосфатного цикла
нарушение активности ферментов гликолиза
нарушение обмена глутатиона
нарушение активности ферментов метаболизма АТФ

г) Гемоглобинопатии:
нарушение структуры и синтеза гемоглобина
нарушение синтеза цепей глобина
нарушение структуры цепей глобина

2. Приобретенные ГА:

а) обусловленные механическим повреждением эритроцитов:
маршевая гемоглобинурия
разрушение эритроцитов протезами клапанов сердца и сосудов
синдром полиагглютинабельности эритроцитов

б) обусловленная нарушением структуры мембраны эритроцитов в результате соматических мутаций:

пароксизмальная ночная гемоглобинурия

в) обусловленные химическим повреждением эритроцитов

солями тяжелых металлов

гемолитическими ядами

медикаментами

г) обусловленные недостатком витамина Е

д) обусловленные разрушением эритроцитов внутриклеточными паразитами

II. Иммуные ГА

1. Аутоиммунные ГА:

а) с неполными тепловыми агглютинами

б) с полными холодowymi агглютинами

в) с двухфазными гемолизинами

г) с тепловыми и кислотными гемолизинами

2. Гетероиммунные

3. Изоиммунные

ГБН

посттрансфузионные

посттрансплационные

4. Трансиммунные

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО – ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ
ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АНЕМИЯХ**

*анемия, гипербилирубинемия, ретикулоцитоз,
гиперплазия эритроидного ростка костного мозга*

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АНЕМИЯ

Морфология Eг



Наследственные гемолитические анемии

Наследственные гемолитические анемии представляют собой большую группу заболеваний, объединяющую ГА, связанные с генетически детерминированным нарушением мембраны эритроцитов, ферментопатиями эритроцитов, и анемии, связанные с нестабильностью гемоглобина.

Наиболее часто встречающимся заболеванием из этой группы является наследственный сфероцитоз наследственная микросфероцитарная анемия (анемия Минковского-Шоффара, наследственный микросфероцитоз) - наследственное заболевание, характеризующееся структурным дефектом эритроцитарной мембраны и трансформацией эритроцитов в микросфероциты. Частота встречаемости составляет 2,2 : 10000 детского населения. Заболевание проявляется с рождения, однако может выявиться в любом возрасте. Пик диагностики приходится на период новорожденности и ранний дошкольный возраст. ГА Минковского – Шоффара наследуется, как правило, по аутосомно-доминантному типу. В 25 % встречаются спорадические случаи, связанные с мутацией гена. В основе микросфероцитоза лежат генетически обусловленные аномалии структурных компонентов эритроцитарных мембран. Чаще всего они представлены дефицитом или отсутствием, снижением активности синтеза и нестабильностью белка спектрина α . Так же возможен сочетанный дефицит и аномалии взаимодействия спектрина и анкирина. Менее значим в патогенезе ГА Минковского – Шоффара дефицит белков полосы 3 и 4.2. Нарушение белковой организации эритроцитарной мембраны приводит к снижению эластичности, повышению её проницаемости, увеличению содержания в клетке осмотически активных веществ, изменению формы и объема эритроцита. Образование сфероцитов связано так же с недостаточным развитием ферментных систем эритроцита (снижение активности энолазы, фосфо-фруктокиназы и др.), приводящим к уменьшению образования аденозинтрифосфата в эритроцитах, и, следовательно, к нарушению процессов активного транспорта через эритроцитарную мембрану. Основная

роль в возникновении гемолитического криза принадлежит снижению осмотической стойкости эритроцитов и их ускоренному разрушению в селезенке в результате несоответствия объема сфероцитов и капилляров синусов селезенки.

Клиническая картина наследственного микросфероцитоза чрезвычайно вариабельна от бессимптомного течения до тяжелой гемолитической анемии, угрожающей жизни. Типичная форма ГА Минковского – Шоффара характеризуется умеренной анемией, желтухой, спленомегалией. Как правило, клинически гемолиз регистрируется во время инфекционных заболеваний, интенсивной физической нагрузки и др. провоцирующих криз факторов. Тяжелые формы наследственного микросфероцитоза редки и проявляются тяжелой анемией, постоянной желтухой, частыми кризами, необходимостью гемотрансфузий по витальным показаниям. Анемический синдром проявляется типичными признаками - слабостью, головокружением, бледностью, тахикардией, утомляемостью и т.п. Его выраженность зависит от степени тяжести анемии. Как правило, анемия легкой и средней степени тяжести, и дети сохраняют компенсированное состояние. Желтушность кожи и слизистых оболочек служит характерным признаком ГА и имеет прямую корреляцию с уровнем гипербилирубинемии. Спленомегалия является следствием разрушения эритроцитов при прохождении ими капилляров синусов селезенки и прогрессирует с различным темпом в зависимости от течения ГА Минковского – Шоффара.

Лабораторными характеристиками анемии Минковского – Шоффара являются микроцитоз, нормо – или гиперхромия эритроцитов, гиперрегенерацич, наличие микросфероцитов более 10 %. Эритроцитометрия указывает на уменьшение диаметра эритроцита, увеличение его средней толщины и сферического индекса. Биохимический анализ крови характеризуется повышением уровня общего билирубина за счет непрямой его фракции, ЛДГ, щелочной фосфатазы.

По данным миелограммы КМ нормоклеточный с нормобластическим типом гемопоэза, гиперплазия эритроидного ростка без нарушения процессов дифференцировки.

Определение осмотической резистентности эритроцитов (до и после инкубации в термостате 24 часа при t 37 °С) указывает на её снижение.

При наследственном микросфероцитозе реакция Кумбса отрицательная и антиэритроцитарные антитела отсутствуют.

Электрофорез белков мембраны эритроцитов в полиакриламидном геле в растворе додецил сульфата в сочетании с количественным определением белков позволяют с высокой достоверностью поставить диагноз ГА Минковского – Шоффара.

Лечебная тактика при наследственном микросфероцитозе включает режимные и терапевтические направления. Важно соблюдение диеты (стол № 5) для сохранения нормального функционирования печени, ограничение физической нагрузки и профилактика инфекционных заболеваний. Медикаментозные и хирургические методы терапии различны в зависимости от периода и течения наследственного микросфероцитоза.

Вне криза специфической терапии не требуется. Показано лечение, направленное на предотвращение гемолитических кризов: витаминотерапия: витамины Е 600 мг/сутки, А 55000 ЕД/сутки, кальция пантотенат 0,1/сутки и С 1,0/сутки курсами по 10-14 дней 2-3 раза в год, гепатопротекторы (урсосан, гепатил, гептрал), фитотерапия (кукурузные рыльца, овес обыкновенный, цветки календулы, тысячелистник, листья мяты перечной, цветки ромашки аптечной, цветки пижмы, амарант). При нарастании MCV назначается фолиевая кислота 1 – 3 мг/сутки в течение 2 недель.

Основным методом патогенетической терапии является спленэктомия, терапевтический эффект от которой связан с ликвидацией приоритетного места разрушения эритроцитов. Показаниями к спленэктомии при ГА Минковского – Шоффара служат синдром гиперспленизма, хроническая высокая гипербилирубинемия, частые гемолитические кризы, наличие арегаторного

криза, желчекаменная болезнь. При проведении спленэктомии обязательна профилактика инфекций, которая заключается в вакцинации и приеме антибактериальных препаратов. Вакцинация проводится за 2 недели до плановой операции (в экстренных случаях – через 2 недели после операции) с использованием вакцины пневмококковой (Pneumovax), менингококковой групп А, С, Y, W (Mencevax ACYW) и Haemophilus influenza (группы Hib) в виде одноразовой инъекции 0,5 мл п/к или в/м с ревакцинацией каждые 5 лет. К методам профилактики инфекционных осложнений после спленэктомии относятся так же профилактический прием антибактериальных средств: амоксициллин внутрь 20 мг/кг в сутки за 3 приема и бисептол 8 мг/кг в сутки 3 раза в неделю в течение 1 месяца, затем бициллин-5 в/м 1 раз в месяц в течение 2-х лет при проведении вакцинации и в течение 5-ти лет при невозможности вакцинации.

Терапия гемолитического криза при наследственном микросфероцитозе включает прием препаратов для конъюгации билирубина (фенобарбитал 10 мг/кг·сут, зиксарин 20 мг/кг·сут) и терапию инфекционного заболевания, послужившего провокатором криза. Инфузионная терапия (0,9 % раствор NaCl, 5 % раствор глюкозы 10 мл/кг в сутки с витаминами В₂ и В₆, кокарбоксилазой, цитохромом) показана при наличии симптомов интоксикации. Назначение глюкокортикостероидов коротким курсом (преднизолон per os 2 мг/кг·сут или парентерально 5 мг/кг·сут, Solu-medrol 30 мг/кг (максимум 2 г в сутки) в течение 3-х дней) значительно сокращает время терапии криза (нормализация концентрации Hb и уровня билирубина).

Аутоиммунные гемолитические анемии

Аутоиммунные гемолитические анемии (АИГА) - гетерогенная группа аутоагрессивных заболеваний и синдромов, обусловленных разрушением эритроцитов, которое вызвано неконтролируемой продукцией антител против собственных эритроцитов. АИГА встречаются с частотой от 1:41 000 до 1:80 000 в любой возрастной группе, однако чаще у взрослых. Причины раз-

вития АИГА разнообразны. АИГА разделяются на первичные (идиопатические) и вторичные, возникающие при других заболеваниях. Вторичные АИГА чаще всего сопряжены с патологией иммунной системы (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит, неспецифический язвенный колит, первичные иммунодефицитные состояния), лимфоидными опухолями, раком толстой кишки, легких, желудка и яичников, некоторыми инфекциями. В одних случаях АИГА обнаруживают в ходе течения основного заболевания, а в других гемолиз может предшествовать, затрудняя своевременную диагностику. Причина развития АИГА связана со срывом иммунологической толерантности к собственным антигенам. В последние годы появились данные, что готовность к подобным нарушениям обусловлена генетическими дефектами Т-лимфоцитов. Известно, что при АИГА, как и при многих других аутоагрессивных заболеваниях, имеет место подавление супрессорной функции Т-лимфоцитов, что способствует увеличению популяции В-лимфоцитов, образующих антитела против собственных структур. Срыв толерантности происходит, когда она формируется в присутствии малых количеств антигена. Толерантность, развившаяся после контакта с большим количеством антигена, практически не исчезает. В качестве примера обычно приводят отсутствие аутоагрессии против антигенов системы АВО. Различные формы АИГА могут иметь в своей основе разные ведущие причины. Имеются сведения о выявлении антилимфоцитарных антител и антилимфоцитотоксинов при различных аутоиммунных заболеваниях. Например, при В-клеточных опухолях аутоантитела – продукт опухолевого клона.

Серологические свойства аутоантител легли в основу деления АИГА на четыре формы:

- 1) с неполными тепловыми агглютинами (частота 80%);
- 2) с полными холодowymi агглютинами (частота 12-15%);
- 3) с тепловыми гемолизинами;
- 4) с двухфазными холодowymi гемолизинами Доната-Ландштейнера (редкая и, как правило, вторичная форма).

Тип антител во многом определяет клинические проявления гемолиза, выбор лечения и прогноз. Свойства аутоантител определяют особенности различных форм АИГА. Неполные аутоагглютины вызывают агглютинацию эритроцитов только в водно-солевой среде, в то время как действие полных проявляется в любой среде. Неполные тепловые антитела фиксированы на эритроцитах и взаимодействуют через Fc-фрагменты иммуноглобулинов с Fc-рецепторами макрофагов, из-за чего теряется часть мембраны эритроцита, изменяется ее биофизическое состояние и, прежде всего, свойства ионных каналов. Это приводит к образованию микросфероцитов и резкому ускорению разрушения эритроцитов в селезенке, а иногда и в печени.

Холодовые агглютинины вызывают транзиторное склеивание эритроцитов на холоде, что приводит к фиксации и активации комплемента на их поверхности с последующим повреждением мембраны. Гемолизины активируют комплемент, повреждающий мембрану внутри сосудистого русла. При этой форме АИГА инфекционный агент может иметь сходство с антигенными структурами эритроцита или на первом этапе несколько видоизменять их, что в последующем приводит к аутоенсибилизации. Наиболее часто в развитии АИГА принимают участие два класса антител: IgG и IgA или IgG и IgM, а также комплемент, что определяет как патофизиологию, так и лечение АИГА. IgM антитела активно фиксируют комплемент, при этом, как правило, прямая проба Кумбса отрицательная. У данной категории пациентов спленэктомия не приводит к прекращению гемолиза, поскольку в разрушении эритроцитов активно участвуют фагоциты печени.

Основные клинические и лабораторные проявления АИГА характеризуются нормоцитарной анемией с быстро нарастающей слабостью и плохой адаптацией даже к умеренному снижению гемоглобина, бледностью и желтушностью кожи и склер, нередко субфебрильной температурой и незначительным увеличением размеров селезенки.

При холодовой гемагглютининовой болезни степень анемии колеблется в широком диапазоне, но, как правило, анемия выражена умеренно и со-

проводятся симптомами, связанными с феноменом склеивания эритроцитов, что затрудняет проведение анализа крови. При длительном охлаждении возможно развитие синдрома Рейно, некрозов и бронхоспазма.

Лабораторное обследование выявляет снижение уровня гемоглобина, от умеренного до тяжелой анемии и соответствующее уменьшение количества эритроцитов при высоком ретикулоцитозе. Число лейкоцитов и тромбоцитов обычно не изменено, но при интенсивном гемолизе возможны лейкоцитоз с омоложением лейкоцитарной формулы, а также тромбоцитоз или тромбоцитопения. В мазке периферической крови, как правило, определяется сочетание микросфероцитов с крупными ортохромными эритроцитами, но в зависимости от свойств антител могут быть холодная агглютинация и, иногда, шизоциты. Ключевые изменения биохимических показателей крови: гипербилирубинемия (преобладает непрямая, неконъюгированная фракция), повышение активности ЛДГ (в зависимости от интенсивности гемолиза).

Прямая проба Кумбса в большинстве случаев положительная, но при массивном гемолизе, а также при холодных и гемолизиновых формах АИГА, вызванных IgA или IgM- аутоантителами, может быть отрицательной. При гемолизиновых формах АИГА и тяжелом гемолитическом кризе с активацией комплемента обнаруживают повышение свободного гемоглобина плазмы (гемоглобинемия), снижение гаптоглобина, темный, бурый или вишневый цвет мочи (гемоглобинурия), положительные тесты на наличие антиэритроцитарных антител.

Дифференциальный диагноз АИГА проводят с другими заболеваниями, протекающими с элементами гемолиза: В₁₂дефицитной анемией; пароксизмальной ночной гемоглобинурией; наследственными гемолитическими анемиями; тромботической тромбоцитопенической пурпурой; маршевой гемоглобинурией; болезнью Вильсона (встречается дебют с гемолитического синдрома); несовместимыми трансфузиями эритроцитов (в частности, без учета резусфенотипа); гетероиммунными гемолитическими анемиями (пени-

циллины, цефалоспорины, сульфаниламиды, вирусные и некоторые бактериальные инфекции).

Дифференциально-диагностический план обследования включает: общий анализ крови с подсчетом количества ретикулоцитов; биохимический анализ крови (включая фракции билирубина, активность ЛДГ, активность аминотрансфераз, общий белок, свободный гемоглобин плазмы и гаптоглобин); прямая проба Кумбса; титр холодных агглютининов; непрямая проба Кумбса (обязательна при интенсивном гемолизе и предшествующих трансфузиях эритроцитов); общий анализ мочи (обязательна визуальная оценка цвета мочи); определение гемосидерина, а также железа, меди и гемоглобина в моче; пункция костного мозга (гиперплазия и морфология эритроидного ростка, количество и морфология лимфоцитов, комплексы метастатических клеток); трепанобиопсия (при необходимости); иммунофенотипирование лимфоцитов (при лимфоцитозе периферической крови и удаленной селезенке); витамин В12, фолаты и гомоцистеин сыворотки; показатели обмена железа (трансферрин, ферритин сыворотки); коагулограмма; волчаночный антикоагулянт; ревматологические пробы (антитела к нативной ДНК, ревматоидный фактор, антинуклеарный фактор, антитела к кардиолипину антигену); иммуноглобулины сыворотки (G, A, M) и криоглобулины; рентгенография легких (при необходимости КТ); эзофагогастродуоденоскопия; ирригоскопия/ректороманоскопия/колоноскопия; УЗИ органов брюшной полости и внутрибрюшных лимфатических узлов, малого таза, щитовидной железы; при необходимости - гормоны щитовидной железы.

Тактика лечения АИГА зависит в первую очередь от ее серологической разновидности и остроты гемолитического криза. При лечении криза первичной и вторичной АИГА принципиальных различий нет. Наибольшие успехи достигнуты в лечении самой распространенной формы АИГАс положительной прямой пробой Кумбса, вызванной неполными тепловыми агглютининами. Первая линия терапии впервые выявленной АИГА, в том числе с острым течением, или повторного гемолитического криза - пульс-терапия ме-

тилпреднизолоном, который вводят в дозе 30 мг/кг в сутки (максимальная суточная доза составляет 2 грамма) в виде внутривенной капельной 30-минутной инфузии в течение 3 дней. При необходимости курс пульстерапии повторяют с интервалом не менее 10 дней.

Эффект первого (двух) курсов определяет дальнейшую тактику лечения. В отсутствие признаков возобновления гемолиза пациент переводится на режим наблюдения. При резистентности к пульс-терапии метилпреднизолоном показана альтернативная терапия или назначение глюкокортикостероидов длительным курсом.

Глюкокортикоидная терапия (преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон) внутрь проводится в начальной дозе по преднизолону 1-2 мг/кг в сутки в течение 21-38 дней с постепенным снижением дозы препарата (2,5 мг за 3 дня до суточной дозы 10 мг, затем отмена препарата проводится медленнее - по 2,5 мг за 7 дней). Стремление к быстрому уменьшению дозы с момента нормализации гемоглобина из-за побочного действия глюкокортикостероидов чревато рецидивом гемолиза.

Внутривенный иммуноглобулин оказывает умеренный и очень короткий эффект и не является самостоятельным методом терапии АИГА. Внутривенный иммуноглобулин вводят в дозе 0,4-0,5 г/кг в сутки в течение 3 дней. Продолжительность ответа редко составляет более 10, и в большинстве случаев не оправдывает данного вида терапии. Показанием к терапии иммуноглобулином при АИГА может служить инфекция или ее профилактика.

Альтернативная иммунная терапия ритуксимабом назначается по следующим показаниям: резистентные формы АИГА с нарастающим количеством различных осложнений; безперспективность глюкокортикостероидной терапии; высокая степень риска осложнений первой линии терапии (артериальная гипертензия, сахарный диабет). Противопоказаниями к назначению ритуксимаба являются непереносимость препарата; активный гепатит В и С; острая вирусная или бактериальная инфекция. В основе лежит общепринятый четырехнедельный курс ритуксимаба с разовой дозой 375 мг/м² в 1, 8, 15

и 22й дни. До начала курса и на 7-8-й день курса проточной цитофлюориметрией в периферической крови определяют количество CD20+ и CD19+ лимфоцитов. При снижении процента этих клеток до уровня менее 1% на 7-8-й день терапии курс ограничивается двумя введениями препарата. Основанием для повторного курса ритуксимаба являются доклинические признаки рецидива гемолиза, определяемые по динамике стандартных лабораторных показателей (гемоглобин, эритроциты, ретикулоциты, ЛДГ, билирубин), а также по результатам более чувствительных методов мониторинга (распределение эритроцитов по плотности, их деформлируемость, фракция незрелых ретикулоцитов (IRF), количество иммуноглобулинов).

Альтернативная иммуносупрессивная терапия циклоспорином может приводить к развитию ремиссии у ранее резистентных пациентов. Препарат может назначаться либо в виде монотерапии, либо в сочетании с преднизолоном. Начальная доза циклоспорина составляет 5 мг/кг в сутки в 2 приема, коррекция в зависимости от базового уровня циклоспорина в сыворотке крови, который следует контролировать еженедельно при подборе дозы, затем раз в 2 недели.

При некупируемом гемолизе после первой и альтернативной линий терапии поднимается вопрос о проведении спленэктомии с учетом прогноза ее эффективности. Удаление селезенки в качестве второй линии терапии проводят больным как с идиопатическими, так и с вторичными формами АИГА, которые более 4 месяцев вынуждены принимать преднизолон, а также в случае отсутствия ремиссии в течение 2 лет при других видах лечения. Определение места преимущественного разрушения эритроцитов, меченных ^{51}Cr или $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Теоксимом, повышает объективность показаний к спленэктомии. Последний метод сопряжен с меньшей лучевой нагрузкой и приемлем в неотложной ситуации. Спленэктомия, как правило, эффективна при повышенной секвестрации эритроцитов в селезенке и мало перспективна при активной фиксации метки в печени, свойственной холодным АИГА. Абсолютными показаниями к спленэктомии при АИГА являются: рецидивы АИГА, не-

эффективность консервативной терапии, противопоказания к назначению глюкокортикостероидов, высокая секвестрация эритроцитов в селезенке и отсутствие ее в печени. Противопоказания к спленэктомии: выраженная секвестрация эритроцитов в печени, длительный прием высоких доз преднизолона к моменту принятия решения, инфекционные осложнения, высокий тромбогенный риск (комплекс неблагоприятных полиморфизмов генов системы свертывания, антифосфолипидный синдром, тромбоз эмболии в анамнезе, мерцательная аритмия).

Цитостатические препараты назначаются пациентам с рецидивирующими АИГА в качестве третьей линии терапии. Как правило, используется циклофосфамид, меркаптопурин, тиогуанин, реже (при холодовой АИГА) - винкристин. На начальном этапе лечения рецидива гемолиза возможно их сочетание с глюкокортикостероидами.

Возможно проведение плазмафереза при холодовой гемагглютининовой болезни, однако полностью ликвидировать симптомы болезни не удастся никогда, а уменьшение титра холодовых агглютининов сохраняется не дольше месяца. Во время процедуры необходимо постоянно подогревать извлеченную кровь, чтобы избежать агглютинации эритроцитов. У таких пациентов наряду с противоэритроцитарными выявляются активные антилимфоцитарные аутоантитела, направленные против Т-лимфоцитов. Иногда, плазмаферез сочетают с лимфоцитаферезом.

Критерии полной ремиссии при терапии АИГА: полное восстановление показателей гемограммы (гемоглобин > 120 г/л, ретикулоциты $< 20\%$), уровня непрямого билирубина и активности ЛДГ продолжительностью не менее 2 месяцев. Критерии частичной ремиссии: гемоглобин > 100 г/л, ретикулоциты менее двух нормальных значений, уровень непрямого билирубина 25 мкмоль/л и ниже продолжительностью не менее 2 месяцев.

Отсутствие ответа на терапию констатируют при незначительной положительной динамике или ответе продолжительностью менее 1 месяца.

При достижении клинической ремиссии полный клинический анализ крови необходимо делать ежемесячно; определение уровня билирубина, активности ЛДГ, иммуноферментное определение количества иммуноглобулинов на мембране эритроцитов каждые 2 месяца; прямую пробу Кумбса каждые 6 месяцев.

1.4. АПЛАСТИЧЕСКИЕ АНЕМИИ

Апластические анемии (АА) - группа заболеваний, обусловленных дефектом стволовой клетки или ее микроокружения, что приводит к уменьшению или отсутствию продукции гемопоэтических клеток, жировому замещению костного мозга и, как следствие, цитопении в периферической крови. Апластические анемии встречаются с различной частотой в зависимости от региона - Европа, Северная Америка, Дальний и Ближний Восток, при этом по данным Интернационального Исследования Агранулоцитозов и Апластической Анемии в Европейских странах частота встречаемости АА составляет в среднем 2,0 на 1 000 000 населения в год при колебании этого показателя в зависимости от страны от 0,6 до 4,0. В Европе частота всех апластических анемий среди детской популяции составляет 1-2 случая на 1 000 000 населения в год, приобретенных АА 2 – 6 случаев на 1 000 000 детского населения в год.

Апластические анемии, как нозологическая форма, гетерогенны и объединяют апластические синдромы с различными этиологическими и патогенетическими механизмами, но имеющие сходные клинические признаки, а также определённую морфологическую и гистологическую картину периферической крови и КМ.

КЛАСИФИКАЦИЯ АПЛАСТИЧЕСКИХ АНЕМИЙ

I. Наследственные и врожденные (генетически детерминированные) АА

анемия Блекфана-Даймонда

анемия Фанкони;

анемия Эстрена-Дамешека
врожденный дискератоз;
анемия Швахмана-Даймонда-Оски;
ретикулярный дисгенез;
амегакариоцитарная тромбоцитопения;
семейные апластические анемии

II. Приобретенные АА

1. идиопатические

2. вторичные:

– постлучевые

– медикаментозные:

- дозозависимые (провоцируют цитостатики, предсказуемы, возможно поражение других тканей)
- идиосинкразические (в результате действия нецитотоксических препаратов (золото, хлорамфеникол, фуросемид, аллопуринол, сульфаниламиды, фенотиазины, нестероидные противовоспалительные), непредсказуемы, другие ткани не поражаются)

– вирусные (вирусы гепатитов, EBV, парвовирус, ВИЧ и др.)

– иммунные (тимомы, гипогаммаглобулинемия, эозинофильный фасциит и др.)

Наследственные апластические анемии

В зависимости от поражения КМ наследственные АА подразделяются на трехростковые, которые могут быть как с врожденными аномалиями развития, так и без них, и парциальные АА с избирательным поражением эритропоэза. Наиболее часто встречаются анемия Блекфена – Даймонда и анемия Фанкони.

АА Блекфана-Даймонда - врожденная форма парциальной красноклеточной аплазии. Развивается спорадически, хотя зарегистрированы аутосомно-рецессивный, аутосомно-доминантный и X-сцепленный типы наследования. При анемии Блекфана-Даймонда патология клеток-предшественниц эритропоэза обу-

словлена нарушением EPO-зависимой стадии дифференцировки, которая не корригируется IL-3 и GM-CSF, мутацией гена, кодирующего рибосомальный протеин S19 (RPS19) и картированного на 19q23 (у 25% пациентов). Мутации гена RPS19 характеризуются t(X;19)(p21;q13), делецией 19q и миссенс-мутацией (Arg62Trp). Ген RPS19, кодирует рибосомальный протеин S19, связанный с 40S рибосомальной субъединицей, экспрессирующийся в гемопоэтической ткани. При его дефектах в эритроидных линиях дифференцировки отмечается повышение активности аденозиндезаминазы, которая снижает чувствительность предшественников эритроидного ростка к EPO, IL-3, IL-6, что, в конечном счете, приводит к нарушению регуляции дифференцировки эритроидных предшественников при сохранении их морфологических и фенотипических характеристик.

Первые клинические признаки анемии Блекфана – Даймонда, как правило, выявляются до 1 года. Существует два типа этой апластической анемии: с пороками или аномалиями развития и без пороков и аномалий развития. Врожденные аномалии развития костей черепа (микротия, микрогнатия, волчья пасть и др.), мочеполового тракта, сердечно-сосудистой систем наряду с гематологическими нарушениями наблюдаются у 25 % больных детей. Парциальная красноклеточная гипоплазия кроветворения развивается в течение первого года жизни, что клинически сопровождается анемическим синдромом – бледность кожных покровов и слизистых, слабость, сонливость, потеря аппетита, тахикардия, одышка и т.п.

Периферическая кровь при анемии Блекфана – Даймонда характеризуется нормохромной нормо- или макроцитарной гипорегенераторной анемией, как правило, средней и тяжелой степени. Количество лейкоцитов и тромбоцитов в норме. Количество эритроцитов, содержащих Hb F, варьирует (повышено или норма). Миелограмма демонстрирует изолированную эритроидную гипоплазию при нормо- или гипоклеточном КМ, лимфоцитоз. По результатам трепанобиопсии обнаруживается снижение объема эритроидной гемопоэтической ткани. Тест на ломкость хромосом с использованием кластогенных агентов (диэпоксидбутан, митомицин С) отрицательный. К дополнитель-

неым диагностическим тестам относятся наличие мутаций в рибосомальных генах (RPS19, RPS10, RPS24, RPS26, RPL5, RPL11, RPL35a, RPS7, RPS17) и повышение активности эритроцитарной аденозиндезаминазы (eADA)

По клиническим и лабораторным характеристикам анемия Блекфана-Даймонда подобна транзиторной детской эритробластопении, которая является следствием вирусной инфекции (как правило, парвовирус В19). Однако, в отличие от анемии Блекфана – Даймонда первые признаки обычно наблюдаются у детей старше 2 лет, маркеры напряжения эритропоэза (увеличение MCV, уровня HbF и уровня антигена I) отсутствуют и диагноз устанавливается часто ретроспективно, поскольку в течение 1- 2 месяцев происходит нормализация гемопоэза (таблица 8).

Таблица 8 - Дифференциально – диагностические признаки транзиторной детской эритробластопении и анемии Блекфана - Даймонда

Признак	Транзиторная детская эритробластопения	Анемия Блекфана – Даймонда
Встречаемость	Часто	Редко
Возраст	6 мес.-4 года	до 1 года
Этиология	Приобретенные	Генетическая
Наследственность	Нет	Есть
Инфекционный анамнез	Вирус (парвовирус В19)	Нет
Пороки развития	Нет	25 %
Длительность течения	1 нед-1 мес.	Пожизненно
Трансфузии	Не зависимы	Зависимы
MCV	Более 85	Более 90
HbF	Норма	Повышен

На сегодняшний день основным терапевтическим подходом при анемии Блекфана – Даймонда является назначение глюкокортикостероидов (ГКС). В современной гематологии глюкокортикоидная терапия не назначается детям с АА Блекфана - Даймонда на первом году жизни в связи с существенным нарушением роста ребенка. Терапию глюкокортикостероидами (преднизолон, метилпред-низолон) начинают через 2 нед после проведенной трансфузии эритроцитной массы в возрасте 12-15 месяцев жизни. При существенных проблемах с венозным доступом и недоступности эритроцитной

массы надлежащего качества (лейкодеплетированной и облученной) ГКС можно начинать с 6 мес; при существенном снижении темпов роста ребенка (менее 30 центилей к 12 мес) старт ГКС терапии можно отложить до 15-18 мес. Стартовая доза ГКС составляет 2 мг/кг/сут в течение 2 - 4 нед, при отсутствии ответа отмена в течение 3 дней; при наличии ответа (стабилизация гемоглобина выше 90 г/л, наличие ретикулоцитов) постепенное снижение дозы ГКС по 0,5 мг/кг в сутки каждые 2 нед, при достижении дозы 1 мг/кг в сутки темп снижения дозы замедляется и составляет каждые 4 недели, возможен переход на альтернирующий режим приема препарата, скорость снижения дозы в этом случае - каждые 8 нед. Максимальная допустимая поддерживающая доза ГКС - < 0,5 мг/кг в сутки. На все время приема пациентом ГКС в суточных дозах более 0,5 мг/кг с целью профилактики осложнений показан прием в возрастной дозе препаратов: ингибиторы протонной помпы (ежедневно), препараты калия (ежедневно), препараты кальция (ежедневно), витамин D, триметоприм/сульфаметоксазол в дозе 5 мг/кг по триметоприму три последовательных дня в неделю. Критериями гематологического ответа на терапию ГКС являются: полная ремиссия при Hb >100 г/л и нормальном числе ретикулоцитов; частичная ремиссия при Hb 85-100 г/л и наличии ретикулоцитов; отсутствие ответа при Hb <85 г/л и ретикулоцитопении.

В случае отсутствия ответа на первое назначение ГКС возможно повторное назначение через 1 ,5-2 года. При отсутствии ответа на повторное назначение ГКС дальнейшие попытки использования ГКС нецелесообразны. В случае получения ответа на ГКС эритроциты сохраняют свои аномальные черты (макроцитоз, высокая активность eADA), что не позволяет констатировать ремиссию или излечение заболевания.

Терапия ГКС эффективна только у части пациентов (50 – 60 %) и не обеспечивает полной гематологической ремиссии. Поэтому сопровождается регулярными гемотрансфузиями. Для программной заместительной терапии должна использоваться эритроцитная масса, фильтрованная от лейкоцитов, для снижения риска различных посттрансфузионных реакций (лихорадка,

цитомегаловирусная инфекция, аллоиммунизация). Пациентам, ранее получавшим иммуносупрессивную терапию, необходимо трансфузировать облученную эритроцитную массу. Пороговое значение Hb для проведения гемотрансфузии: для детей первого года жизни 90 г/л; для пациентов старше 1 года 70 г/л. Рекомендуется нормотрансфузионный режим заместительной программной терапии эритроцитной массой, т.е. содержание Hb после трансфузии должно составлять 115-120 г/л. Объем трансфузируемой эритроцитной массы 10-15 мл/кг, кратность - каждые 3 - 4 нед. Для трансфузии используется индивидуально подобранная лейкодеплементированная и облученная эритроцитная масса. Перед первой трансфузией эритроцитной массы необходимо проведение фенотипирования эритроцитов пациента по системе АВ0, Rh-фактору и редким группам крови (Kell и др.). Трансфузионную заместительную терапию эритроцитной массой не рекомендуется сочетать с ГКС терапией в связи высоким риском осложнений.

Заместительная терапия эритроцитной массой должна сопровождаться адекватной хелаторной терапией, которая начинается как можно раньше, оптимально с 6 месяцев, но не позже 2 лет. Хелаторная терапия служит обязательным компонентом лечения, поскольку гемосидероз внутренних органов является основным осложнением при анемии Блекфана – Даймонда и причиной угрожающих жизни состояний. Хелаторную терапию рекомендуется начинать после 5 трансфузий эритроцитной массы и/или повышения ферритина сыворотки >500 мкг/л. Отменяться хелаторная терапия может при достижении верхней границы возрастной нормы содержания ферритина сыворотки при условии прекращения заместительной трансфузионной терапии и нормализации содержания железа в печени и миокарде, оцененных методом МРТ T2* (для печени возможно методом определения содержания железа в сухом веществе печени). Используемые хелаторы: деферазирокс и дефероксамин. Начальная доза деферазирокса 30 мг/кг в сутки внутрь ежедневно, далее с шагом 5 мг/кг в сутки повышается до максимальной суточной дозы 45 мг/кг или понижается в зависимости от концентрации ферритина сыворотки. При

содержании ферритина сыворотки менее 500 мкг/л доза снижается до 125-250 мг/сут. Дефероксамин применяется в начальной дозе 40 мг/кг в сутки подкожно 5 дней в неделю в виде длительной инфузии (8-12 ч), при необходимости интенсивной хелации, в случае развития застойной сердечной недостаточности 100 мг/кг в сутки непрерывно внутривенно капельно в течение 7-10 дней. Для интенсификации хелаторной терапии может использоваться комбинация деферазирокса 30 мг/кг в сутки внутрь ежедневно в сочетании с дефероксамином 40-50 мг/кг в сутки подкожно ежедневно в течение 8-12 ч). Применение деферипрона в качестве препарата 1-й линии нецелесообразно в связи с высоким риском развития агранулоцитоза, и его назначение возможно только при наличии противопоказаний к деферазироксу и дефероксамину.

Радикальным методом терапии анемии Блекфана – Даймонда является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от родственного или неродственного HLA-совместимого донора, однако эффективность и риск осложнений ТГСК снижает применение данного метода при относительно успешной консервативной терапии. То есть ТГСК используется при отсутствии эффекта на ГКС-терапию (ГСК) и может рассматриваться как альтернатива пожизненной заместительной терапии эритроцитарной массой для пациентов младше 9 лет. По данным европейских регистров анемии Блекфана-Даймонда бессобытийная выживаемость при проведении ТГСК от родственного HLA-совместимого донора в возрасте младше 9 лет составляет 94%, а в более старшем возрасте 55%. При проведении ТГСК от неродственного HLA-совместимого донора у пациентов младше 9 лет бессобытийная выживаемость составляет 85%.

Имеются данные по клиническому использованию в терапии анемии Блекфана- Даймонда IL 1, IL3, EPO, лейцина (700 мг/м² три раза в сутки), сотатерцепта (0,75-1,0 мг/кг подкожно каждые 3 нед), однако в клинических рандомизированных исследованиях эффективность такой терапии не доказана и она требует дальнейшего тщательного изучения.

Анемия Фанкони – заболевание с аутосомно-рецессивным путем наследования, характеризующееся геномной нестабильностью, наличием врожденных аномалий, прогрессирующей аплазией всех ростков костного мозга и предрасположенностью к злокачественным новообразованиям.

Раннее изучение этиопатогенеза АА Фанкони позволило установить, что клетки при этом заболевании проявляют хромосомную нестабильность и гиперчувствительны к ДНК-сшивающим агентам. Так же было показано, что клетки пациентов АА Фанкони дефектны в репарации ДНК, несущей пири-мидиновые димеры, возникшие вследствие воздействия ультрафиолетовых лучей, и имеют недопустимо низкую активность ДНК-лигазы. Современная гематология располагает достаточно глубокими данными о фенотипических особенностях клеток при АА Фанкони:

- чувствительность к мутагенам
- удлинение G2 фазы и прекращение S фазы клеточного цикла
- дефект чувствительности к кислороду (низкий рост в присутствии кислорода, высокая продукция свободных радикалов кислорода, дефицит антиоксидантной защиты, в первую очередь – супероксиддисмутазы)
- высокая чувствительность к ионизирующему облучению (специфическая G2 - фаза)
- гиперпродукция TNF α
- дефект репарации ДНК и аккумуляция ДНК - аддуктов
- нестабильность генома (повышенная ломкость хромосом и способность к мутациям)
- повышенный апоптоз
- дефект индукции P53
- дефект стволовой клетки (низкая способность стволовой клетки к выживанию и угнетение роста гемопоэтических колоний *in vitro*)

При АА Фанкони определенные фенотипы коррелируют с определенными мутациями. Сложность данного заболевания заключается в обилии ге-

нов, которые могут его провоцировать. Первый «ген-виновник» АА Фанкони был обнаружен 13 лет назад, и с тех пор постепенно происходит прогресс изучения генетики АА Фанкони. На сегодняшний день известно 19 генов АА Фанкони. Один из них (FANCB) находится на X-хромосоме, остальные – на аутосомах. Каждый из этих генов отвечает за синтез определенного протеина, так или иначе участвующего в процессе репарации ДНК. Генетические подгруппы АА Фанкони, связанные с наличием мутаций в одном и том же гене, принято называть группами комплементации. Определение групп комплементации основано на возможности клеточных линий, полученных от пациентов с мутациями в разных генах АА Фанкони, функционально дополнять друг друга: происходит преодоление остановки клеточного цикла в фазе G2/M при слиянии или существенное снижение числа характерных поломок в тесте с алкилирующими агентами. При наличии мутаций в одном и том же гене этого не происходит. Такой подход позволяет лишь выявить ген, в котором произошла мутация, без ее точного определения. По этому принципу выделены основные группы – группы комплементации: FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M, -N, -O. Для некоторых крайне редких вариантов они пока не обозначены. Клеточные линии для такого анализа получают путем культивирования лимфоцитов больного АФ с известной мутацией либо преимущественно генно-инженерным путем – трансфекцией ретровирусного вектора, экспрессирующего соответствующую форму протеина. При этом имеет место высокая степень фенотипической изменчивости даже в пределах семей. В общих чертах генез АА Фанкони заключается в том, что в связи с определенными ошибками в ДНК клеточные структуры, считывающие информацию с этой цепочки, во время деления клетки не могут завершить свою функцию и разделить информацию, что приводит к разрывам нитей ДНК и закреплению мутаций.

При анемии Фанкони дефектна как сама цепь ДНК, так и система её репарации. В биологической системе отвечающей за репарацию ДНК человека и сохранение наследственной информации в первоначальном виде обна-

ружено 2 новых гена, BRCA1 и BRCA2, обуславливающих анемию Фанкони. В то же время точного механизма нарушения репарации не установлено. Известно, что каждый из вновь обнаруженных двух генов просто присоединяется к ДНК во время ее деления и копирует сам себя.

При АА Фанкони нарушается способность клетки исправлять определенный тип повреждений ДНК – поперечные межхроматидные сшивки (DNA interstrand crosslink), которые препятствуют работе репликационной вилки. Поперечные межхроматидные сшивки формируются как под воздействием продуктов естественного метаболизма клетки (в первую очередь эндогенных альдегидов, но также и активных форм кислорода), так и под воздействием химических веществ, в частности химиотерапевтических препаратов. К такому типу химических веществ относятся алкилирующие соединения, имеющие в своем составе 2 активные (в результате свободной валентности) алкильные группы, обеспечивающие им активное связывание с определенными основаниями. Это такие вещества, как цисплатин, митомицин С, азотистый иприт, псорален, диэпоксидбутан, мелфалан, циклофосфамид, мустарген, стрептозоцин и другие препараты этих групп. Они существенно различаются по химическому строению и повреждающему потенциалу. Алкилирующие агенты вызывают и другие повреждения ДНК, и поперечные межхроматидные сшивки составляют лишь небольшую их часть. Описаны алкилирующие агенты со специфичностью к определенным сайтам ДНК. Протеины, функция которых нарушается при АА Фанкони, задействованы во всех этапах репарации межхроматидной поперечной сшивки. Этот сложный многоступенчатый процесс получил название FA-pathway, а протеины, задействованные в нем, – FA -протеины. Ключевую роль в этом процессе играет моноубиквитинирование гена FANCD2, который координирует процессы вырезки поврежденных нуклеотидов, прямое достраивание поврежденного участка и гомологичную рекомбинацию. При АА Фанкони клетка неспособна адекватно исправлять повреждения ДНК, накопление поломок которой может приводить к недостаточности кроветворения, аномалиям развития и предрасположенно-

сти к развитию опухолей. Самыми распространенными являются мутации FANCA, составляя приблизительно две трети всех случаев (таблица 9).

Таблица 9 – Гены, связанные с развитием анемии Фанкони

№	Ген	Частота встречаемости мутаций, %	Исследование	Функция	Особенности
1	<i>FANCA</i>	60–70	MLPA, секвенирование	Core complex моноубиквитинирование ID complex	Вариабельность выраженности клинических проявлений. Большое разнообразие мутаций, около 40 % составляют крупные делеции. Есть этнически ассоциированные мутации
2	<i>FANCB</i>	~2	MLPA, секвенирование	Core complex моноубиквитинирование ID complex	X-связанное наследование, гетерозиготы
3	<i>FANCC</i>	~14	ПЦР, ПЦР в РВ, MLPA, секвенирование	Core complex моноубиквитинирование ID complex	90 % случаев представлено двумя мутациями с.711+4A>T (ассоциирована с тяжелыми клиническими проявлениями у евреев ашкенази) и delG332 (сравнительно легкое течение, 50 % случаев анемии Фанкони у голландцев)
4	<i>FANCD1/BRCA2</i>	~3	Секвенирование	Эффекторные протеины, гомологичная рекомбинация	Раннее и частое развитие опухолей/лейкоза. Гетерозиготное носительство ассоциировано с развитием рака молочной железы и яичников
5	<i>FANCD2</i>	~3	Секвенирование	ID complex, передача сигнала эффекторным протеинам	
6	<i>FANCE</i>	~3	Секвенирование	Core complex моноубиквитинирование ID complex	
7	<i>FANCF</i>	~2	Секвенирование	Core complex моноубиквитинирование ID complex	
8	<i>FANCG/XRCC9</i>	~10	Секвенирование	Core complex	Раннее развитие миелодисплазии/лейкоза
9	<i>FANCI</i>	~1	Секвенирование	ID complex передача сигнала эффекторным протеинам	
10	<i>FANCL/BRIP1</i> или <i>BACH1</i>	~2	секвенирование	Downstream proteins Гомологичная рекомбинация	
11	<i>FANCL/POG</i>	~0,2	Секвенирование	Core complex моноубиквитинирование ID complex	
12	<i>FANCM</i>	~0.2	Секвенирование	Core complex моноубиквитинирование ID complex	
13	<i>FANCN/PALB2</i>	~0.7	MLPA, секвенирование	Downstream proteins Гомологичная рекомбинация	Раннее и частое развитие опухолей/лейкоза
14	<i>FANCO/RAD51C</i>	Единичные случаи	MLPA, секвенирование	Downstream proteins Гомологичная рекомбинация	Гетерозиготное носительство ассоциировано с развитием рака молочной железы и яичников
15	<i>FANCP/SLX4</i>	~0,2	Секвенирование	Downstream proteins Нуклеазный комплекс, эксцизия нуклеотидов	
16	<i>FANCO/ERCC4</i>	~0,2	Секвенирование	Downstream proteins Нуклеазный комплекс, эксцизия нуклеотидов	
17	<i>FANCR/RAD51</i>	Единичные случаи	Секвенирование	Downstream proteins Гомологичная рекомбинация	
18	<i>FANCS/BRCA1</i>	Единичные случаи	Секвенирование	Downstream proteins Гомологичная рекомбинация	Гетерозиготное носительство ассоциировано с развитием рака молочной железы и яичников
19	<i>FANCT (UBE2T)</i>	Единичные случаи	Секвенирование	Взаимодействие с core complex	

Известно более 100 мутаций, из которых около трети приходится на точковые, еще треть представляют микроделеции, и около 40 % представлены крупными делециями. Описаны также и малые дупликации. По действию мутации в гене FANCA могут быть гипоморфными – т. е. приводить к частичной потере функции белка, они характеризуются более мягкими клиническими проявлениями, однако большая часть мутаций вызывает полную потерю функции. Ряд мутаций в гене FANCA имеет повышенную частоту распространения, например микроделеция в 38-м экзоне с.3788_3790delTCT – самая распространенная мутация при АА Фанкони в мире (20,7 % всех аллелей с мутацией). Функционально и фенотипически варианты мутаций в гене FANCA проявляются одинаково, в отличие от мутаций, например, в гене FANCC, когда клинические проявления при одном варианте мутации могут сильно различаться даже у сиблингов.

Удельный вес FANCC и FANCG составляет 25 % случаев, FANCE и FANCF - 8 %. С другими группами мутаций связаны менее 1 % случаев АА Фанкони (таблица 9). FANС гены кодируют протеины с различным молекулярным весом и функциями, которые локализуются в цитоплазме или в ядре. Мутации в гене FANCC встречаются в 10– 15 % случаев АА Фанкони.

Из них почти 90 % случаев представлено двумя мутациями – с.711+4А>Т и delG332. Самая частая мутация в гене FANCC – с. 711+4А>Т, ее выявляют в гомозиготном состоянии в 80 % случаев АА Фанкони у евреев ашкенази, и она проявляется сравнительно тяжелым фенотипом. FANCG задействован в 10 % случаев АА Фанкони, встречаются практически все типы мутаций, за исключением крупных делеций. Клинически эти случаи характеризуются более частым и быстрым развитием миелодисплазии или лейкоза. Встречаются как спорадические случаи, так и этнически ассоциированный вариант – около 80 % случаев АА Фанкони у чернокожих южноафриканцев (Bantu-speakers) (Южная Африка, Свазиленд, Малави и Мозамбик) имеют мутацию 637_643delTACCGCC. Заболевание характеризуется частыми нарушениями пигментации кожи, слабовыраженными аномалиями развития и сравнительно

поздними, но тяжелыми гематологическими проявлениями, обусловленными в том числе и поздним обращением к врачу. Мутации остальных генов встречаются довольно редко, их спектр приведен в таблице 9.

За редким исключением клиническая картина АА Фанкони складывается из гематологических синдромов и различных врожденных аномалий развития органов и систем. Пациенты с АА Фанкони имеют типичный фенотип. При рождении ребенка анализ крови обычно нормальный, часто первым гематологическим критерием является макроцитоз, как правило, анемия и тромбоцитопения предшествуют нейтропении, но темпы начала и прогрессирования варьируют. Панцитопения типично развивается к 5 - 9 годам, медиана возраста манифестации составляет 7 лет. Клинически цитопенические синдромы проявляют себя классически: бледность, головокружение, утомляемость и др., петехиальная сыпь, экхимозы и кровотечения, рецидивирующие инфекции. Аномалии развития при АА Фанкони встречаются у 85 % пациентов и могут затрагивать любую систему организма. Наиболее высокий удельный вес врожденных дефектов костной системы и кожи (таблица 10).

Таблица 10 - Частота врожденных аномалий при анемии Фанкони

Локализация или вид аномалии	Частота, %
Скелет	71
Кожа	64
Низкорослость	63
Глаза	38
Почки и мочевыводящие пути	34
Репродуктивная система	20
Задержка умственного развития	16
Желудочно – кишечный тракт	14
Сердечно – сосудистая система	13
Органы слуха	11
Центральная нервная система	8

Самыми частыми аномалиями скелета являются гипоплазия лучевой кости и больших пальцев кистей рук, с меньшей частотой встречаются врож-

денный вывих бедра, сколиоз и др. аномалии позвоночника. Характерна гиперпигментация кожи, пятна по типу «кофе с молоком» и области гипопигментации. Пациенты с АА Фанкони характеризуются низкорослостью, выявляемой с рождения. Этот факт связывают с гормональным дефицитом роста или гипотиреозом. Обычны микрофтальмия, микроцефалия с задержкой психического развития, глухота. Приблизительно треть пациентов с АА Фанкони имеют почечные аномалии – эктопия, аплазия, гипоплазия, подковообразная почка, удвоение лоханок и мочеточников и др. Так же характерны гипогонадизм, крипторхизм, гипоспадия, бесплодие. Менее обычные аномалии для АА Фанкони включают дефекты, желудочно – кишечного тракта (атрезии, трахео – эзофагеальный свищ и др.), сердечно-сосудистой системы (открытый артериальный проток, ДМЖП, стеноз легочной артерии, стеноз и коарктация аорты), центральной нервной системы (гидроцефалия, аномалии спинного мозга). Только 15 – 27 % больных АА Фанкони не имеет никаких очевидных врожденных аномалий.

Генетическая нестабильность при АА Фанкони является причиной частого развития опухолей при данной патологии - к 20 годам - у 20 % пациентов, а к 45 годам - у 75% пациентов АА Фанкони. Чаще всего это острые миелоидные лейкозы, миелодиспластические синдромы. Солидные опухоли развиваются у лиц в возрасте старше 17 лет. Кроме того, риск развития опухолей у членов семьи больных АА Фанкони составляет 18 – 25%.

Гемограмма при АА Фанкони характеризуется вариабельной цитопенией от моно- до панцитопении в зависимости от периода болезни. Анемия нормохромная, макро- или нормоцитарная. Повышено количество эритроцитов, содержащих Hb F. В миелограмме выявляется аплазия и лимфоцитоз. Трепанобиопсия указывает на снижение объема гемопоэтической ткани.

Золотым стандартом» скрининга для выявления АА Фанкони был и остается тест с диэпоксидбутаном (ДЭБ, DEB, 1,3-butadienediepoхide) и его

вариант с митомицином С (ММС). Еще в начале изучения АА Фанкони было отмечено, что фибробласты и лимфоциты при АА Фанкони в культуре клеток демонстрируют спонтанную повышенную ломкость хромосом. Позже была показана повышенная чувствительность клеток пациентов с АА Фанкони к действию алкилирующих агентов, вызывающих поперечные сшивки между нуклеотидами, что препятствует образованию нормальной репликативной вилки для запуска процесса репарации ДНК, позже получивших общее название *interstrand cross-link agent*. На основании этого был предложен цитогенетический метод диагностики АА Фанкони: после обработки лимфоцитов или фибробластов алкилирующим веществом (в нелетальной для клеток концентрации) определяют частоту и спектр спонтанных и индуцированных *in vitro* хромосомных aberrаций. Обычно ставится несколько параллельных клеточных культур стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитов периферической крови: без добавления алкилирующего агента (для определения спонтанного уровня aberrаций) и с его добавлением в разной концентрации. Затем в метафазных пластинках подсчитывают число хромосомных разрывов. Для АА Фанкони характерны разрывы хромосом с образованием радиальных фигур, фрагментов, хромосомных и хроматидных разрывов, а также три- и тетрадиалов. При анализе результатов учитывают число разрывов по отношению к числу проанализированных метафаз, процент клеток с разрывами и ряд других показателей. Необходимо отметить, что значения, при которых тест на ломкость хромосом считается положительным, в различных лабораториях варьируются. Тест не имеет 100 % специфичности. Положительный тест на ломкость хромосом бывает у пациентов с синдромом Ниджмегена (мутации в гене NBS1), синдромом Робертса (мутации в гене ESCO2), Warsaw breakage syndrome (мутации в гене DDX11), синдромом Блюма (ген BLM), врожденном дискератозе и некоторых других синдромах. Примерно у четверти пациентов при проведении теста на ломкость хромосом число клеток с характерными для АА Фанкони aberrациями – хроматидными

обменами с образованием три- и тетрарадиалов и фрагментами – не превышает диагностический порог. При этом клинические проявления могут быть характерными для АА Фанкони. Это проявление так называемого соматического мозаицизма – существования 2 популяций клеток: с нормальным фенотипом и с фенотипом АА Фанкони. Мозаицизм встречается примерно в 20 % случаев, что может приводить к ложноотрицательным результатам анализа хромосомных поломок при высоком проценте нормальных клеток и потребовать проведения дополнительных диагностических тестов. Показано, что к мозаицизму приводит дополнительная новая мутация или спонтанная реверсия врожденной мутации, приводящая к восстановлению пути репарации ДНК. Такие ревертированные клетки могут частично компенсировать костномозговую недостаточность. Реверсия может произойти в клетке-предшественнике гемопоэза или только в лимфоидном предшественнике. Единых критериев определения мозаицизма при АА Фанкони нет, около 10 % пациентов имеют менее 50 % aberrантных клеток. При подозрении на мозаицизм проводится исследование фибробластов кожи на ломкость хромосом. Если результаты теста по-прежнему неоднозначны, требуется более подробное генетическое тестирование.

При кариотипировании клеток КМ могут быть обнаружены клональные хромосомные перестройки уже на стадии гипоплазии кроветворения. При прогрессировании в миелодиспластический синдром или лейкоз частота клональных хромосомных поломок увеличивается. Самой частой перестройкой является моносомия 7. Спектр остальных перестроек довольно разнообразен, однако специфичные для ОМЛ транслокации встречаются достаточно редко. Для АА Фанкони характерны перестройки: add1q, add3q, моносомия 7. В редких случаях клональная амплификация 3q26–q29 может быть отмечена до развития миелодиспластических синдромов или ОМЛ, однако риск прогрессирования в ОМЛ у таких пациентов крайне высок.

Выявление накопления мононуклеарных клеток периферической крови в фазе G2/M клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии (более 20 %) – дополнительный метод исследования в случае сомнительных результатов теста на ломкость хромосом. Обработка клеток алкилирующими агентами помимо характерных хромосомных поломок индуцирует остановку клеточного цикла в фазе G2. В данном тесте фибробласты кожи напрямую экспонируются с ММС, АФ подозреваются, когда большая фракция клеток аккумулярована в фазе G2.

Определение группы комплементации возможно в лаборатории, обладающей достаточным опытом и специализацией. Исследование это довольно трудоемкое, а результаты необходимо подтверждать секвенированием гена. Его применяют для определения гена, в котором произошла мутация, и для подтверждения патогенности новых мутаций, по своей сути он больше может быть отнесен к функциональным тестам. Секвенирование по Сэнгеру долгие годы было основным методом определения мутаций при АА Фанкони. Учитывая значительные размеры генов, секвенирование каждого из них представляет довольно трудоемкий и дорогостоящий процесс. Его обычно проводили после анализа на группу комплементации, предварительно определив вероятный ген. Анализ нуклеотидной последовательности для всех известных при АА Фанкони генов затруднен количеством возможных мутаций в каждом, их разнообразием, в том числе в виде крупных инсерций или делеций (indel-мутации). Их длина может варьировать от одного до нескольких сотен и даже тысяч нуклеотидных оснований, что подразумевает использование совершенно разных методов молекулярно-генетического исследования.

Метод MLPA (мультиплексная амплификация лигазносвязанных проб) предназначен для определения делеций и амплификаций определенных последовательностей гена длиной до нескольких десятков нуклеотидов. Одновременно может быть исследовано до 60 таких последовательностей, что позволяет выявить как сравнительно небольшие делеции, так и делеции

отдельных экзонов и целого гена. Метод MLPA используют для инициального скрининга делеции в гене FANCA, параллельно ген FANCA полностью секвенируют. Если пациент мужского пола – исследуют на наличие делеций ген FANCB. Выпущены коммерческие наборы для исследования FANCA, FANCD2, PALB, RAD50, RAD51. Выявленные делеции желательно подтвердить вторым методом. При этом методы, которые могут быть использованы, требуют индивидуальной разработки в каждом конкретном случае: количественная ПЦР, ПЦР длинных фрагментов (long range PCR) и хромосомный микроматричный анализ.

Высокопроизводительное секвенирование является методом, позволяющим одновременно анализировать от нескольких генов до полного генома, – наиболее подходящий для определения мутаций при АА Фанкони. Возможны несколько подходов. Первый – секвенирование экзона, позволяет получить максимальный объем информации. Второй подход подразумевает секвенирование ограниченного числа интересующих и уже описанных в литературе генов (таргетное ресеквенирование), список которых можно дополнять или модифицировать в соответствии с потребностями исследования. Современные коммерческие панели генов, как правило, помимо генов АА Фанкони включают большое число генов, ответственных за развитие других врожденных синдромов, в том числе и подобных АА Фанкони. Внедрение в практику высокопроизводительного секвенирования позволяет избежать последовательного трудоемкого исследования каждого из известных генов методом секвенирования по Сэнгеру, однако пока не позволяет с должной уверенностью выявить крупные делеции и дупликации (CNV – вариации числа копий генов). Найденные мутации требуют подтверждения одним из подходящих других методов. При обнаружении новых мутаций необходимо подтверждение их патогенности в функциональном тесте и др.

В соответствии с международными рекомендациями стратегия молекулярно-генетического исследования на сегодняшний день должна включать следующие этапы.

Тест на ломкость хромосом положительный:

- Целевой скрининг мутаций для некоторых популяционных групп.
- Выявление наиболее частых делеций гена FANCA методом MLPA.
- Исследование известных генов АФ методом высокопроизводительного секвенирования.
- Исследование CNV одним из доступных методов.

Тест на ломкость хромосом отрицательный:

- Продолжение молекулярно-генетического поиска только при строгих клинических показаниях.

Тест на ломкость хромосом неоднозначный:

- Тест на ломкость хромосом в фибробластах кожи.
- Исследование методом высокопроизводительного секвенирования или другим методом мутаций генов, характерных для других синдромов нестабильности генома со сходным фенотипом.

Основной терапией АА Фанкони является аллогенная ТГСК. Для этой группы пациентов весьма ограничен выбор родственных доноров. В последние 15 лет успешно практикуется трансплантация стволовой клетки пуповинной крови. С момента первой успешной аллогенной ТГСК пуповинной крови, выполненной Gluckman et al. в 1988 году для лечения ребенка с АА Фанкони, развитие банков пуповинной крови и ее трансплантаций при этом заболевании стабильно увеличивается. Генная диагностика для родителей, имеющих ребенка с АА Фанкони, для получения стволовой клетки из пуповинной крови предполагает сортировку эмбрионов не только по отсутствию генов АА Фанкони, но и в соответствии с HLA антигенами, что в конечном итоге приводит к успешному получению донора, однако является этически спорным вопросом.

Традиционными методами консервативной терапии служат андрогены, глюкокортикоиды и десферал. Из андрогенов применяют per os даназол 600 – 800 мг/сутки, оксиметалон 2,5 мг/кг в сутки, тестостерон 10 мг/м² в сутки). Эти препараты увеличивают производство и выделение ЕРО

и клеточность КМ. После получения терапевтического ответа требуется снижение дозы в течение трех месяцев, чтобы сократить побочные эффекты, которые включают маскулинизацию, угри, гиперактивность, усиление роста с преждевременным закрытием эпифизов, повышение активности трансаминаз, потенциальный риск развития аденом и аденокарцином печени (контроль ферменты печени, билирубин, альфа-фетопротеина каждые два - три месяца и ежегодно УЗИ). Глюкокортикостероиды назначают в начальной дозе 2 мг/кг в сутки с постепенным снижением и подбором индивидуальной поддерживающей дозы.

Цитокины G-CSF, GM-CSF могут улучшить гематологический ответ в сочетании с андрогенами или при отсутствии ответа на андрогены. Однако, они не должны использоваться у пациентов с клоновыми цитогенетическими отклонениями и должны быть прекращены, если такие отклонения развиваются из-за потенциального риска стимулирования лейкоза.

Десферал назначается 3-х – 6-ти недельными курсами 10 – 30 мг/кг в сутки в виде 12-ти часовой подкожной инфузии в зависимости от гиперферритинемии, частоты гемотрансфузий.

Трансфузионная терапия с заместительной целью проводится отмытыми эритроцитами, тромбоконцентратом индивидуально по мере необходимости (декомпенсированный анемический синдром, кровотечения, угроза кровоизлияний, кровотечений).

Большое будущее при АА Фанкони принадлежит генотерапии. В экспериментальных исследованиях на животных была продемонстрирована успешная попытка фенотипического исправления хромосомных поломок (FANC C), используя ретровирусную генную передачу. На сегодняшний день клинические испытания с использованием ретровирусных векторов оказались неутешительны. Однако исследования в этом направлении продолжаются.

В семьях, где имеется пациент с АА Фанкони или где ранее установлены патогенетические мутации показано проведение пренатальной и преим-

плантационной диагностики. В этом случае проводится целенаправленный поиск известной мутации. Исследование планируется заранее в специализированной лаборатории. Материалом для диагностики служат клетки плода, получаемые путем биопсии ворсин хориона на 10–12-й неделе беременности. Следует помнить, что генетический анализ занимает определенное время (не менее 2–3 нед). Если нет возможности провести молекулярно-генетическое исследование, возможно выполнение теста на ломкость хромосом клеток ворсин хориона на 10–12-й неделе беременности либо при амниоцентезе (15–18-я неделя). Однако молекулярно-генетическое исследование предпочтительнее. Иногда АА Фанкони может быть заподозрена при ультразвуковом исследовании и косвенно подтверждена путем исследования мутаций у родителей.

Приобретенные апластические анемии

Приобретенная апластическая анемия (ПАА) - заболевание, характеризующееся различной тяжести панцитопенией (редко - бицитопенией), не имеющей тенденции к спонтанному восстановлению, при сниженной клеточности КМ и отсутствии цитологических, цитогенетических и молекулярно-генетических признаков острого лейкоза, миелодиспластического синдрома или миелофиброза, а также гепатоспленомегалии и массивной лимфаденопатии. Приобретенная апластическая анемия является редким заболеванием и встречается с частотой 2-6 на 1 000 000 детского населения в год. Возрастных пиков заболеваемости не наблюдается. Заболевание практически с одинаковой частотой поражает детей обоего пола. Подавляющее большинство случаев приобретенной апластической анемии не поддается этиологической идентификации и классифицируется как идиопатические. На долю приобретенной апластической анемии с известной этиологией приходится 10-20% случаев; большинство этих случаев являются гепатит-ассоциированными.

В целом представление о патогенезе ПАА было сформировано в 1970 - 1980 годах и основывалось на возможной дефектности стволовых клеток, повреждении костномозгового микроокружения и нарушении иммунной регуляции кроветворения. С помощью культуральных исследований было обнаружено значительное снижение способности КМ к репопуляции, проявляющееся уменьшением количества клеток, иницирующих долгоживущие культуры и являющихся по сути прототипом стволовых гемопоэтических клеток. При этом функция стромы КМ в большинстве случаев остается неповрежденной. При ПАА отмечается нормальная или даже повышенная способность стромальных клеток продуцировать гемопоэтические ростовые факторы, обладающие функцией регуляторов пролиферации и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток. Иммунофенотипирование клеток КМ при приобретенных АА выявило уменьшение количества клеток, экспрессирующих CD34. Таким образом было доказано, что недостаточность кроветворения при ПАА не является результатом дефицита ростовых факторов.

Лимфоидные клетки периферической крови при ПАА характеризовались повышением популяции активированных лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к IL 2, наличием инверсии соотношения CD4+ и CD8+ и способностью активированных Т лимфоцитов оказывать угнетающее действие на КМ. При ПАА важную роль в патогенезе заболевания играет аутоиммунная агрессия по отношению к гемопоэзу. Этот путь повреждения КМ может быть как первоначальным и ведущим механизмом развития ПАА, так и вторичным, развившимся в ответ на повреждение стволовых клеток.

Ведущая роль в развитии костномозговой недостаточности при ПАА отводится нарушению цитокиновой регуляции кроветворения. Активированные цитотоксические Т - лимфоциты продуцируют IFN γ и TNF α , являющиеся ингибиторами нормального гемопоэза и подавляющие образование гемопоэтических колоний *in vitro*. Активная пролиферация Т-лимфоидных клеток обеспечивается высокой продукцией IL2 лимфоцитами ПК. Воздействие на клетки IFN γ и TNF α вызывает усиление экспрессии на клеточной мембране

Fas рецептора, являющегося проапоптотическим фактором. Связывание Fas рецептора с Fas-лигандом, вырабатываемым цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками, приводит к индукции апоптоза в клетках-мишенях. В результате активация этих процессов происходит нарушение жизнеспособности гемопоэтических клеток и развитие аплазии КМ. Первоначальный антигенный сигнал, приводящий к активации иммунной системы, срыву толерантности и аутоиммунной деструкции гемопоэза при приобретенных АА в большинстве случаев остаётся неизвестным и тогда речь идёт об идиопатической АА. К возможным этиологическим факторам можно отнести ряд лекарственных средств (хлорамфеникол, препараты золота, противосудорожные средства, нестероидные противовоспалительные препараты и др.) или химических соединений (бензол). Патогенез лекарственной АА остаётся неясным. Возможно, имеет место генетически обусловленная идиосинкразия или воздействие лекарственных препаратов и химических соединений может сопровождаться как непосредственным токсическим действием на стволовые клетки, так и через активацию иммунной агрессии по отношению к собственному гемопоэзу.

Современная гематология располагает доказательной базой этиологической роли в развитии ПАА вирусов, в первую очередь, вирусов гепатитов, парвовируса В19. ПАА, развившуюся в течение первых 6 месяцев течения острого вирусного гепатита, считают гепатитассоциированной АА. Однако и в хроническую фазу вирусного гепатита могут возникать внепеченочные проявления вирусной инфекции, в том числе и АА. Установлена возможность репликации вирусов гепатита в клетках крови, КМ и иммунной системы и доказана способность вирусов гепатита ингибировать рост колоний и дифференцировку клеток-предшественников. Однако в настоящее время большинство исследователей признаёт, что гепатитассоциированная АА скорее всего является следствием активации иммунной системы, происходящей в ответ на вирусную инфекцию и приводящей к развитию аплазии КМ. Непо-

средственной мишенью для парвовируса В19 являются эритроидные клетки-предшественники, поражение которых может привести к развитию аплазии.

Цитогенетические исследования, проводимые при ПАА, как правило, не выявляют каких - либо определённых хромосомных aberrаций, свидетельствующих о наличии патологического клеточного клона, но многолетние клинические наблюдения указывают на связь ПАА с такими клональными заболеваниями, как пароксизмальная ночная гемоглобинурия и острые лейкозы. Клоновые осложнения у больных ПАА развиваются, как правило, вторично на фоне клинко-гематологической компенсации в результате иммуносупрессивной терапии. При этом пароксизмальная ночная гемоглобинурия диагностируется в 9 – 13 % случаев, риск развития острого лейкоза в течение 10 лет после иммуносупрессивной терапии сохраняется у 9,5 % - 6,5 % пациентов. Однако с помощью анализа полиморфизма ДНК X-хромосомы была выявлена возможность клонального гемопоэза при ПАА. Исследования последних лет обнаружили наличие общего для части пациентов с ПАА и пароксизмальной ночной гемоглобинурии молекулярного дефекта, возникающего в результате соматической мутации гена *PIG-A*, связанного с X хромосомой. Ген *PIG-A* участвует в синтезе белкового комплекса – гликозилинозитолфосфолипидного якоря (GPI), способного инактивировать комплемент на поверхности клеток. Дефицит GPI белкового комплекса на поверхности клеток является специфическим признаком пароксизмальной ночной гемоглобинурии и, в тоже время, маркёром клональности гемопоэза. Интерпретация результатов, полученных при изучении нарушений экспрессии гена *PIG-A* при ПАА, достаточно сложна и не позволяет в настоящее время раскрыть природу гемопоэтического дефекта при ПАА. Высказываются предположения о том, что появление даже небольшого клона *PIG-A* дефектных гемопоэтических клеток может оказаться причиной иммунной атаки, направленной на нормальные гемопоэтические клетки и приводящей к развитию аплазии кроветворения. С другой стороны, присутствие клона клеток, характеризующихся дефицитом *PIG-A* при ПАА, расценивается как результат селекции клонов

под воздействием иммунной агрессии в отношении собственного кровотока.

Клиническая картина ПАА определяется развитием трёхростковой цитопении зависит от её тяжести. Выделяют нетяжелую, тяжелую и сверхтяжелую формы приобретенной АА.

При сверхтяжелой ПАА клеточность КМ по данным трепанобиопсии $<25\%$ (или клеточность $>25\%$, но $<50\%$ при содержании миелоидных элементов $<30\%$) и 2 или более из следующих признаков: нейтрофилы $<0,2 \cdot 10^9/\text{л}$; тромбоциты $<20 \cdot 10^9/\text{л}$; скорректированный ретикулоцитоз $<1\%$ (менее 40 000/мкл).

При тяжелой ПАА клеточность КМ по данным трепанобиопсии $<25\%$ (или клеточность 25%-50% при содержании миелоидных элементов $<30\%$) и 2 или более из следующих признаков: нейтрофилы $>0,2 \cdot 10^9/\text{л}$, но $<0,5 \cdot 10^9/\text{л}$; тромбоциты $<20 \cdot 10^9/\text{л}$; скорректированный ретикулоцитоз $<1\%$ (менее 40 000/мкл).

Все остальные случаи, не соответствующие критериям тяжелой и сверхтяжелой АА классифицируются как нетяжелая АА. Однако при наличии необходимости в регулярных трансфузиях эритроцитарной массы и/или тромбоконцентрата ПАА не может считаться нетяжелой

Анемический синдром при АА (бледность, утомляемость, тахикардия, головокружение, одышка, гемодинамические нарушения и т.п.) имеет значительное выражение соответственно концентрации и скорости снижения гемоглобина. Геморрагический синдром характеризуется петехиально-пятнистым типом кровоточивости (геморрагические высыпания на коже, слизистых полости рта, носовые и десневые кровотечения, кровоизлияния в склеры, на глазном дне и другой локализации, маточные и желудочно-кишечные кровотечения, гематурия и т.п.) и степень его проявления зависит от количества тромбоцитов. Инфекционные осложнения развиваются в результате нейтропении (стоматиты, бронхиты, кишечные инфекции, ангины, пневмонии, сепсис).

Гемограмма при ПАА характеризуется нормохромной нормоцитарной гипорегенераторной анемией, тромбоцитопенией, лейко- и нейтропенией, относительным лимфоцитозом. В костном мозге по данным миелограммы у больных ПАА имеет место гипоклеточность, резкое снижение эритрокариоцитов, уменьшение количества гранулоцитарных клеток при относительном лимфоцитозе. Мегакариоциты или отсутствуют, или их количество значительно снижено. При гистологическом исследовании костного мозга (трепанобиопсия) выявляется картина аплазии кроветворения: диффузное заполнение костномозговых полостей жировой тканью со снижением кроветворных островков менее 25 % от нормы, в ряде случаев отмечается полное исчезновение последних. Иммунофенотипирование клеток КМ демонстрирует снижение содержания CD34+ клеток. Тест на ломкость хромосом с использованием кластогенных агентов (диэпоксидбутан, митомицином С) отрицательный. При культуральных исследованиях отмечается угнетение роста клеточных колоний с нарушением ответа на цитокиновые стимулы.

Наличие аплазии по данным трепанобиоптата (преобладание жировой ткани над деятельным костным мозгом) в сочетании с трехростковой цитопенией (анемия, гранулоцитопения и тромбоцитопения) и признаками угнетения кроветворения по данным миелограммы служит основанием диагностировать ПАА. При этом необходимо проведение комплекса исследований с целью исключения ряда заболеваний, при которых возможно развитие вторичной АА или синдрома аплазии кроветворения: системные заболевания соединительной ткани, милиарный туберкулёз, хронический гепатит и другие вирусные инфекции, метастазирующие солидные опухоли, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, злокачественные лимфопролиферативные заболевания. С этой целью используются соответствующие лабораторные тесты: титр РНК, ДНК, проба Кумбса, проба Хема, ревматоидный фактор, детальный анамнез заболевания (токсины, облучение, лекарства и т.п.), серологические исследования на вирусы (вирусы гепатитов, ВИЧ, вирус Эпштейн – Бара, парвовирус В19 и др.).

Основными направлениями в терапии ПАА является ТГСК и иммунная супрессия с целью подавления функциональной активности определённых субпопуляций лимфоидных клеток. Аллогенная ТГСК проводится при наличии HLA- совместимого донора детям с тяжелой и сверхтяжелой формами АА. Этот метод лечения является радикальным и позволяет добиться длительной выживаемости большинства больных ПАА. HLA-идентичный родственный донор – 65 – 90 % случаев выздоровление, результаты этого метода терапии лучше в возрасте пациента до 20 лет. По данным Европейской рабочей группы по изучению ТГСК и апластической анемии 5 -летняя выживаемость в группе пациентов моложе 25 лет составляет 85 %. Одной из основных причин снижения эффективности ТГСК у пациентов с ПАА является высокая частота развития реакции «трансплантат против хозяина», которая отмечается у детей до 10 лет в 19 % случаев, в возрасте 11 - 30 лет - в 46 % случаев, а у пациентов старше 30 лет - в 90 % случаев. Основные составляющие успеха ТГСК при ПАА - состоятельность трансплантата, отсутствие реакции «трансплантат против хозяина», отсутствие поздних осложнений.

Отсутствие в большинстве случаев гистосовместимого донора КМ и высокий риск развития реакции «трансплантат против хозяина» препятствуют широкому использованию ТГСК при лечении пациентов с ПАА. Для подавляющего большинства пациентов терапией выбора является комбинированная иммуносупрессивная терапия (ИСТ). Современная ИСТ предполагает одновременное или последовательное применение нескольких методов иммуносупрессии. В клинической практике в рамках ИСТ используются два типа иммуноглобулинов: антилимфоцитарный (АЛГ) и антитимоцитарный (АТГ). Это поликлональные Ig G, содержащие антитела к мембранным антигенам Т-лимфоцитов, а также антитела к В лимфоцитам, НК-клеткам и моноцитам, получаемые из сыворотки животных (лошадиной, кроличьей, козьей), иммунизированных лимфоцитами или тимоцитами здоровых доноров. Механизм действия АЛГ/АТГ неоднозначен. Основным и наиболее важным является иммуносупрессивный эффект, обусловленный цитотоксиче-

ским действием, направленным против Т-лимфоцитов и их элиминация. Кроме того, АЛГ/АТГ способны усиливать секрецию Т-лимфоцитами ИЛ-3 и гранулоцитарно – макрофагального колониестимулирующего фактора, а моноцитами ИЛ-1 и ИЛ-6. АЛГ/АТГ имеют непосредственное стимулирующее влияние на гемопоэтические клетки-предшественники, усиление апоптоза Т-лимфоцитов, активированных ИЛ –2. Наиболее рационально использование больших доз АЛГ/ АТГ в течение короткого 4 - 5 дневного курса:

Лошадиные АЛГ/АТГ - Лимфоглобулин (Pasteur Merieux) 50-75 мг/кг на курс, АТГАМ (Pharmacia-Upjohn) 160 мг/кг на курс;

Кроличьи АЛГ/АТГ - Тимоглобулин (Pasteur Merieux) 12,5-25 мг/кг на курс, АТГ Fresenius 40- 60 мг/кг на курс, Genzyme 18,75 мг/кг на курс;

Козий АЛГ - Антилимфолин 120-160 мг/кг на курс.

Удлинение курса введения препарата до 10 дней и более не повышает эффективности лечения. Введение АЛГ или АТГ может сопровождаться аллергическими реакциями в виде лихорадки, озноба, эритематозной или уртикарной сыпи, которые, как правило, купируются кортикостероидными и антигистаминными препаратами. В случаях развития тяжелых аллергических осложнений (бронхоспазм, гипотония, отёк Квинке) введение АЛГ/АТГ прекращается. В период 5 - 20 дней после начала курса возможно развитие сывороточной болезни, сопровождающаяся лихорадкой, сыпью, кожным зудом, полиартралгиями, миалгиями. У некоторых больных течение сывороточной болезни может осложняться повышением артериального давления, тошнотой, желудочно-кишечными расстройствами, лимфаденопатией, транзиторным повышением активности трансаминаз. В редких случаях развивается иммунная тромбоцитопения и иммунная гемолитическая анемия. Токсичность АЛГ/АТГ контролируется кортикостероидными гормонами и антигистаминными средствами.

Второй составляющей современных комбинированных программ ИСТ при ПАА является циклоспорин А (CsA), обеспечивающий интенсивную и длительную иммуносупрессию. CsA - один из метаболитов грибка

Tolipocladium inflatum, циклический полипептид, состоящий из 11 аминокислот и обладающий универсальным иммуносупрессивным действием. Механизм действия CsA связан с ингибированием продукции ИЛ-2 и ИЛ-2 зависимой пролиферацию Т-лимфоцитов за счет блокирования лимфоцитарной активности. CsA связывается с внутриклеточными рецепторами- иммунофилинами и подавляет активность специфического белкового комплекса - кальцинеурина, необходимого для активации нуклеарного фактора активированных Т-лимфоцитов. При этом происходит нарушение синтеза некоторых лимфокинов: ИЛ-2, необходимого для пролиферации Т-лимфоцитов, а так же ИЛ-4, CD40-лиганда, TNF- α и γ - IFN. При этом на продукцию GM-CSF и ИЛ-3 CsA не влияет. Эффективность терапии CsA зависит от тяжести болезни, продолжительности курса применения и значительно повышается при использовании CsA после АЛГ/АТГ или спленэктомии. При продолжительности курса лечения не менее 12 месяцев CsA эффективен у 64 % больных тяжелой АА и 94 % больных нетяжелой ПАА. Стартовая доза CsA составляет 5 мг/кг в сутки на 2 приема с последующим изменением суточной дозы в зависимости от индивидуальной переносимости под контролем уровня CsA в сыворотке крови (базовая (перед приемом) концентрация CsA 120-250 нг/мл). В среднем снижение дозы CsA происходит на 10 % каждые 2 недели. Длительность терапии индивидуальна, в среднем полная курсовая доза достигается за 18 месяцев.

На фоне приёма CsA возможно развитие таких осложнений, как повышение артериального давления, нарушение функции почек (олигурия, повышение содержания креатинина крови) и печени (гипребилирубинемия, повышение активности трансаминаз), нарушения функции желудочно-кишечного тракта, часто наблюдается гиперплазия дёсен, реже – гинекомастия, гипертрихоз, в редких случаях может иметь место неврологическая симптоматика в виде эпилептиформных приступов. Все токсические осложнения, как правило, носят обратимый, дозозависимый характер и разрешаются при снижении суточной дозы препарата или его временной отмене (на 3 -5

дней). Приём CsA должен контролироваться динамическим наблюдением за биохимическими показателями крови (креатинин, билирубин, трансаминазы, электролиты – калий, кальций, магний), а также определением содержания CsA в сыворотке. Некоторые лекарственные препараты способны выступать модуляторами метаболизма CsA - рифампицин и фенобарбитал снижают, а низорал и эритромицин повышают метаболизм циклоспорина.

Включение в программу ИСТ ростовых факторов повышает ее эффективность, сокращая время развития положительного ответа на лечение и уменьшая возможность появления тяжелых инфекционных осложнений, являющихся, как правило, основной причиной ранних смертей. Доказана эффективность гранулоцитарного КСФ и отсутствие эффекта при применении гранулоцитарно – макрофагального КСФ, IL-3, EPO, IL-6.

Эффективность ИСТ во многом зависит от качества поддерживающей терапии: адекватной заместительной терапии компонентами крови и профилактики инфекционных осложнений. В трансфузионной терапии используются тромбоциты (в зависимости от проявлений геморрагического синдрома, на курсе АТГ – ежедневно, фильтрованные (Immugard IV, PALL), с ограничением числа доноров и проверкой качества), отмытые эритроциты и фильтрованная эритромаасса. Профилактика инфекций осуществляется организационными (качественные катетеры, отмена забора крови из пальца, запрещение в/м инъекций, диета) и медикаментозными (антимикотики при гранулоцитах < 200/мкл - итраконазол (аспергиллез) и флюконазол, антибиотики (офло-, ципрофлоксацин) при гранулоцитах < 200/мкл, гранулоцитарный КСФ) средствами.

Глава 2

ГЕМОБЛАСТОЗЫ

2.1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ОНКОГЕНЕЗА

Канцерогенез представляет собой сложный патофизиологический процесс зарождения и развития опухоли. При всем разнообразии макроскопических и ультраструктурных признаков, а также, биохимических, иммунологических и генетических параметров, характеризующих злокачественные новообразования, последние развиваются по определенным законам. Иными словами, у самых разных типов опухолей есть много общего на различных этапах возникновения и прогрессирования. В основе канцерогенеза лежат повреждения генетического аппарата клеток по типу мутаций. Это могут быть как генные нарушения, при которых изменяется количество или последовательность моноклеотидов в пределах одного гена, так и геномные, при которых изменяется число хромосом или их наборов. Генетическая концепция канцерогенеза подразумевает, что популяция опухолевых клеток является результатом пролиферативного процесса, идущего от одной клетки-родоначальницы клона, претерпевшей опухолевую трансформацию. Эта теория формирует представления о моноклональном развитии опухолей. Основоположником мутационной теории рака можно считать Теодора Бовери, ещё в 1914 году высказавшего предположение о том, что нарушения в хромосомах приводят к образованию раковых клеток. После было обнаружено влияние ионизирующего излучения на мутации, а также множество других связей. На сегодняшний день учеными распознано более 100 опухоль-ассоциированных генов. Для возникновения злокачественного новообразования необходимо наличие в клетке ряда генетических изменений, освобождающих ее от воздействия различных регуляторов клеточного деления и дифференцировки, а затем накопились дальнейшие изменения, делающие ее способной к инвазии и метастазированию. На протяжении многих десятилетий и до настоящего времени исследователи пытаются выделить основные харак-

теристики злокачественных новообразований, которые на клеточном и молекулярном уровне отличают опухолевые клетки от нормальных. К настоящему времени сформулированы основные и дополнительные признаки, однако эти характеристики изменяются и дополняются в результате значительного прогресса, достигнутого в последние годы в области экспериментальной онкологии, молекулярной генетики и биохимии.

Биологическая характеристика злокачественной клетки

Признаки, отличающие опухолевую клетку от клетки нормальной ткани, включают в себя поддержание постоянной пролиферативной сигнализации, уклонение от действия опухолевых супрессоров, избегание апоптоза, увеличение времени жизни клетки, стимуляцию ангиогенеза, активацию инвазии и метастазирования. Подобные свойства приобретаются в ходе прогрессирования опухоли, т.е. различных изменений ее фенотипа, обычно в сторону увеличения злокачественности. Формирование этих признаков определяется и направляется процессами, происходящими на генетическом уровне. Кроме того, важной характеристикой опухолевой клетки является способность к взаимодействию с клеточным микроокружением и формирование опухолевой стромы.

Существование сравнительно небольшого набора молекулярно-биологических изменений, которые приводят к неопластической трансформации, указывает на то, что все клетки организма имеют схожие молекулярные механизмы, регулирующие их пролиферацию, дифференцировку и гибель. Гены, контролирующие эти процессы можно условно разделить на две группы: доминантные онкогены (позитивные регуляторы роста), которые возникают из протоонкогенов в результате их неконтролируемой активации, и рецессивные гены-супрессоры опухоли (негативные регуляторы роста), которые, как правило, являются ингибиторами протоонкогенов. Активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров приводит к одинаковым, по своей сути, эффектам. Важно отметить, что комплекс генетических изменений,

приводящий к появлению у опухолевых клеток полного спектра приобретенных способностей, характерен в основном для солидных опухолей, которые претерпевают довольно длительный первичный этап эволюции, и в меньшей степени для лейкозов.

Основные признаки опухолевой клетки и ключевые молекулярные процессы, нарушение которых лежит в основе онкогенеза, впервые были сформулированы Дугласом Ханахэном и Робертом Вайнбергом в 2000 г. По мнению этих исследователей, разнообразие генотипов злокачественных клеток проявляется нарушением физиологии клетки, так называемыми приобретенными способностями (*acquired capabilities*). К ним относят независимость от сигналов роста и нечувствительность к ингибиторам роста клетки, уклонение от процесса запрограммированной клеточной гибели, безграничный репликационный потенциал (иммортализация), поддержка регенерации тканей за счет ангиогенеза, способность к тканевому проникновению (инвазия) и отсутствие тканевой видоспецифичности (метастазирование). В настоящее время список приобретенных способностей опухолевых клеток постоянно уточняется и дополняется. К наиболее важным дополнениям можно отнести блокировку клеточной дифференцировки и генетическую нестабильность.

Описание нестабильности ДНК является одним из важных факторов в понимании природы опухоли, поскольку состояние генетической нестабильности служит универсальной характеристикой всех видов злокачественных новообразований и причиной формирования опухолевого фенотипа. Так как ДНК представляет собой высокодинамичную структуру, генетическая нестабильность является основой эволюции, нормального индивидуального развития и одновременно злокачественной трансформации. Каждому организму присущ свой собственный видовой и индивидуальный уровень общей и тканевой генетической нестабильности и, соответственно, наследственной предрасположенности к раку, который при этом изменяется как под влиянием окружающей среды, так и с возрастом. На хромосомном уровне генетическая нестабильность проявляется анеуплоидией, транслокациями, делециями, ин-

версиями, рекомбинацией сестринских хроматид, ломкостью хромосом, появлением двойных мини-хромосом, а на уровне ДНК – точечными мутациями, микроделециями и микроинсерциями, генной амплификацией, микросателлитной нестабильностью, дефектами системы репарации повреждений ДНК.

Генетическая нестабильность является движущей силой постоянных изменений в геноме опухолевых клеток и приводит к генерации большого числа генетически неоднородных субклонов клеток опухоли, способных к селективному преодолению различных биологических барьеров (генетическая пластичность). Те стрессовые состояния, которые возникают в опухолевых клетках под влиянием окружающей среды, помогают им приобретать новые способности для выживания. Например, использование гликолиза при метаболическом стрессе позволяет опухолевым клеткам адаптироваться к гипоксии и при этом закислять свое микроокружение, что, в свою очередь, позволяет им избегать иммунного надзора. А повышенная концентрация реактивных форм кислорода при окислительном стрессе приводит к увеличению уровня повреждений ДНК, что становится причиной появления новых генетических aberrаций. Все опухоли в процессе своей эволюции приобретают набор перечисленных выше способностей, однако последовательность их появления и молекулярные механизмы, лежащие в их основе, сильно варьируют. Поэтому каждая опухоль, по сути, является индивидуальным, специфичным для конкретного пациента, образованием.

В настоящее время ученым известно более 100 различных типов и подтипов опухолей человека. Однако, на основании того факта, что все клетки организма обладают сходными молекулярными механизмами пролиферации, дифференцировки и гибели, стало возможным выделение небольшого числа общих для всех типов опухолей человека молекулярных, биохимических и клеточных особенностей. Основываясь на этом постулате, огромный каталог опухолевых генотипов может быть представлен проявлением шести принципиальных изменений клеточной физиологии, которые в совокупности приво-

дят клетку к злокачественному росту: самодостаточность в отношении ростовых сигналов, нечувствительность к рост-ингибиторным сигналам, уклонение от запрограммированной клеточной смерти (апоптоза), неограниченность репликативного потенциала, ангиогенез, тканевая инвазия и метастазирование.

Самодостаточность опухолевой клетки в поддержании клеточной пролиферации означает отсутствие потребности в митогенных (ростовых) сигналах для перехода из покоящегося состояния в состояние активной пролиферации. В клетках нормальной ткани эти сигналы передаются внутрь трансмембранными рецепторами, которые связывают различные классы лигандов: цитокины, гормоны и другие ростовые факторы, компоненты экстраклеточного матрикса, адгезионные и другие молекулы межклеточных взаимодействий. Опухолевая клетка постоянно генерирует собственные ростовые сигналы, роль которых тем или иным способом исполняют клеточные онкогены, и поэтому не зависят от экзогенной ростовой стимуляции. Эта независимость от влияния тканевой микросреды является результатом разрушения важного гомеостатического механизма, который в норме обеспечивает сбалансированное сосуществование и взаимодействие различных типов клеток в ткани. Если в нормальной ткани митогенные ростовые факторы синтезируются одним типом клеток, чтобы стимулировать пролиферацию другого, то раковые клетки приобретают способность синтезировать ростовые факторы, на которые они сами отвечают, создавая петлю позитивной обратной связи, так называемой аутокринной регуляцией. Автономность опухолевых клеток подтверждает их способность продуцировать некоторые ростовые факторы. Кроме того, клеточные рецепторы, передающие ростовые сигналы внутрь клетки, сами являются объектом дисрегуляции в ходе онкогенеза, поскольку их гиперэкспрессия или структурные изменения делает опухолевую клетку чувствительной к таким уровням ростового фактора, которые в норме не могут запустить пролиферацию. Также в опухолевой клетке может происходить переключение типов интегринов, выполняющих функцию рецепторов белков

внеклеточного матрикса. Эти бифункциональные гетеродимерные структуры физически прикрепляют клетку к структурам внеклеточного матрикса, передают в цитоплазму специфические сигналы, которые влияют на поведение клетки, выводят ее из покоящегося состояния, регулируют пролиферацию и апоптоз. Разрушение этих внеклеточных связей придает клетке подвижность. Наиболее сложные механизмы приобретения пролиферативной автономии заключаются в изменениях компонентов цитоплазматических путей сигнальной трансдукции, которые получают и процессируют сигналы, передаваемые лиганд-активированными рецепторами ростовых факторов и интегринами.

Нечувствительность к рост-ингибиторным сигналам опухолевой клетки связана с механизмом, который приводится в действие, в первую очередь, TGF β . Антипролиферативное действие TGF- β основано на активации ингибиторов циклинзависимых киназ семейств Ink4 и Cip/Kip, приводящей к остановке клеточного цикла. Связывание TGF- β со своим рецептором вызывает образование транскрипционных комплексов Smad4, Smad2,3, которые транслоцируются из цитоплазмы в ядро. Это приводит к активации генов ингибиторов циклинзависимых киназ p21WAF1/CIP1, p15INK4b, p27KIP1a и репрессии гена MYC, что вызывает подавление активности Cdk4,6 и Cdk2, ответственных за продвижение по G1 и вход в S-фазу. В нормальной ткани действует множество антипролиферативных сигналов, поддерживающих покоящееся состояние клеток. Эти антиростовые сигналы принимаются трансмембранными клеточно-поверхностными рецепторами, и могут блокировать пролиферацию различными механизмами. Во-первых, клетка может быть принудительно выведена из активного клеточного цикла в покоящееся состояние (фаза G0), из которого она может возвратиться при поступлении внеклеточного пролиферативного сигнала. Во-вторых, клетка может быть полностью лишена своего пролиферативного потенциала, будучи индуцирована к вхождению в постмитотическое состояние, обычно ассоциированное с приобретением специфических признаков дифференцировки. Большинство механизмов, которые позволяют нормальным клеткам отвечать на антипроли-

феративные сигналы, ассоциировано с клеточным циклом, со структурами, управляющими прохождением клеткой фазы G1. Клетка мониторирует окружающую среду в течение этого периода и на основании улавливаемых сигналов решает, продолжать ли ей пролиферацию, перейти в фазу G0 или в постмитотическое состояние. На молекулярном уровне эти антипролиферативные сигналы осуществляются посредством протеинов pRb, p107 и p130. В гипофосфорилированном состоянии pRb блокирует пролиферацию, выключая функцию фактора E2F, контролирующего экспрессию банка генов, существенных для перехода клеточного цикла из фазы G1 в S-фазу. В опухолевой клетке разрушение TGF- β освобождает фактор E2F и делает клетку нечувствительной к антиростовым факторам, следовательно, освобождает пролиферативную активность. Причиной утраты контроля над пролиферацией может быть нарушение любого звена путей, трансдуцирующих TGF β -сигнал к циклиновым комплексам, фосфорилирующим протеин Rb. По мере развития опухоли TGF- β способствует конверсии ранних опухолей в инвазивные, метастазирующие, участвуя в опухолевой прогрессии. Доминирование проонкогенной активности TGF- β реализуется посредством его участия в процессах эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза, а также в процессе формирования иммунной супрессии.

Отсутствие репликативного старения (иммортализация) и неограниченный пролиферативный потенциал опухолевые клетки приобретают в результате дисрегуляции клеточной пролиферативной программы. Большинство типов зрелых клеток человека обладают специфическим механизмом ограничения числа делений. Например, в культуре человеческих фибробластов *in vitro* после 60-80 делений (так называемое число Хейфлика) наблюдается необратимая остановка размножения клеток, когда они входят в жизне-способное постмитотическое состояние старения (senescence) и затем постепенно гибнут. В опухолевых клетках эта автономная программа контроля репликации нарушена, и для образования опухоли из одной клетки-родоначальницы в условиях жесткого давления со стороны организма, когда

многие опухолевые клетки погибают, обеспечивается огромное число делений. Переход в состояние старения индуцируется, в том числе, высокой экспрессией онкогенов, таких как Ras. Дисфункция генов-супрессоров Rb и p53 ведет к сохранению пролиферативной возможности клетки в состоянии старения. Пролиферативный потенциал существует до наступления кризисного состояния, когда наблюдается нарушение кариотипического порядка, ассоциированное со слиянием концов хромосом, клеточная гибель и случайное появление вариантов со способностью к неограниченной пролиферации. Большинство типов опухолевых клеточных линий имеет иммортализованный фенотип, следовательно, неограниченный репликационный потенциал приобретается во время злокачественной трансформации и является существенным фактором опухолевого роста. Старение клетки отражает механизм, который инициирует выход аберрантной клетки в необратимое состояние митотического покоя и лишает ее возможности продолжать пролиферацию. Этот механизм активируется противоречивыми ростовыми сигналами или укорочением теломер. Именно в теломерах, состоящих из нескольких тысяч повторов коротких шестинуклеотидных элементов, оказалось скрыто «Счетное приспособление» для клеточных поколений. Каждое деление сопровождается потерей нуклеотидных последовательностей на конце хромосомы. Причина этого прогрессирующего укорочения в неспособности ДНК-полимеразы полностью реплицировать 3'-концы хромосом. Дефект теломер лишает их способности защищать хромосомную ДНК от слияния концов хромосом и приводит к кариотипическому беспорядку, ассоциированному с кризисным состоянием, в норме почти неминуемо переходящим в апоптоз. Поддержание теломер имеет место практически во всех типах опухолевых клеток, в большинстве случаев оно достигается благодаря нерегулируемой экспрессии теломеразы, которая добавляет гексануклеотидные повторы к концам теломерной ДНК, а в остальных случаях - благодаря рекомбинационному механизму межхромосомного обмена последовательностями. Тем или иным механизмом длина теломер не допускается до критического уровня,

что в свою очередь предоставляет возможность неограниченного роста клеточного клона.

Приобретенная резистентность к апоптозу является одной из причин роста популяции опухолевых клеток наряду с высокой скоростью пролиферации. Апоптотическая программа приводится в действие множеством физиологических сигналов и представляет собой серию этапов: фрагментация ядра, деградация хромосом, удаление цитозоли, разрушение цитоплазматического и ядерного скелета, разрыв клеточной мембраны, утилизация клеточных фрагментов. Механизм апоптоза состоит из сенсорных и эффекторных компонентов. Сенсорные сигналы ответственны за контроль появления отклонений от нормы внутри- и внеклеточной среды, определяют дальнейшую судьбу клетки и регулируют компоненты, функционирующие как эффекторы апоптотической гибели. Внутриклеточные сенсоры активируют апоптотический путь при выявлении аномалий, например повреждение ДНК, сигнальный дисбаланс, провоцируемый гиперэкспрессией онкогенов, нехватка факторов выживания и гипоксия. Сигналы смерти передаются связыванием Fas-лиганда (FasL) с его рецептором и TNF с его рецептором TNF-R1. Поскольку апоптоз является основным барьером развития опухоли, опухолевые клетки приобретают резистентность к апоптозу различными путями. Самым распространенным вариантом потери проапоптотической регуляции являются мутации опухолевого супрессора гена p53, которые обнаруживаются более чем в 50% опухолей и приводят к функциональной инактивации ключевого сенсора повреждений ДНК и индуктора апоптотического эффекторного каскада. Сигналы, вызываемые другими аномалиями, включая гиперэкспрессию онкогенов, также осуществляются через p53 и оказываются неспособными вызвать апоптоз в отсутствие функционально активного p53. Потеря функции гена p53 позволяет клеткам преждевременно входить в S-фазу, следствием чего становится появление клеток с аномальными кариотипом и пloidностью.

Опухолевый ангиогенез является необходимым условием прогрессии новообразования. В ином случае клетки опухоли, не получая кислород и питательные вещества, будут погибать. В ходе ангиогенеза близость капиллярной сети обеспечивается координированным ростом сосудов и паренхимы, и в формирующейся ткани процесс ангиогенеза тщательно регулируется. В настоящее время известно несколько десятков эндогенных индукторов и ингибиторов ангиогенеза. Стимуляторы ангиогенеза передаются растворимыми факторами и их рецепторами, представленными на поверхности эндотелиальных клеток. Важную роль в этом процессе также играют интегрины и молекулы клеточной адгезии. Внеклеточные протеазы физически и функционально связаны с проангиогенными интегринными, что создает предпосылки к появлению инвазивных свойств ангиогенных эндотелиальных клеток. Неоваскуляризация является предпосылкой быстрой клональной экспансии и формирования макроскопической опухоли. Во многих опухолях ангиогенное переключение осуществляется путем усиления транскрипции генов, кодирующих индукторы ангиогенеза (такие как VEGF и/или FGF), и, следовательно, сдвига равновесия индукторов/ингибиторов ангиогенеза в пользу первых. В других опухолях обнаружено подавление экспрессии эндогенных ингибиторов (тромбоспондина 1 или интерферона- α). Наконец, в некоторых опухолях встречаются изменения обоих типов. Механизмы поддержания баланса между регуляторами ангиогенеза во многом недостаточно изучены. В клетках некоторых типов обнаружена позитивная регуляция тромбоспондина-1 опухолесупрессирующим белком p53. Следовательно, потеря функции p53 может быть причиной падения уровня тромбоспондина-1 и освобождения эндотелиальных клеток от его ингибиторного действия. Активация онкогена Ras или потеря гена-супрессора опухолей VHL обуславливает в некоторых клеточных типах усиление экспрессии фактора VEGF. Другой механизм регуляции возникает в форме протеаз, которые контролируют биодоступность ангиогенных активаторов и ингибиторов. Координированная экспрессия про- и антиангиогенных сигнальных молекул и ее протеолитическая модуляция

обеспечивают комплексную гомеостатическую регуляцию ангиогенеза нормальных тканей и сосудистой целостности. Опухолевый ангиогенез присущ солидным опухолям всех типов и в связи с этим представляет собой привлекательную мишень для разработки новых терапевтических стратегий.

Изменения морфологии и движения клеток являются важнейшим свойством опухолевых клеток. В основе морфологических нарушений лежат взаимосвязанные между собой изменения цитоскелета, адгезионных взаимодействий клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом. Вкратце, они выражаются в нарушении формирования фокальных контактов и ухудшении прикрепления клеток к внеклеточному матриксу, дезорганизации системы актиновых микрофиламентов. Это приводит к изменениям активности псевдоподий и подвижности. В целом, наблюдаемая картина напоминает изменения, возникающие в нормальных клетках при действии митогенных цитокинов - факторов, стимулирующих миграцию клеток. Однако так называемый локомоторный фенотип в неопластических клетках, как правило, сильно утрирован, что позволяет различать по морфологии опухолевую клетку от движущейся нормальной клетки.

Способность к тканевой инвазии и метастазированию является чрезвычайно сложной функцией опухолевой клетки, и генетические и биохимические детерминанты этих процессов еще не полностью изучены. На механическом уровне они тесно связаны между собой, что оправдывает их объединение в общее свойство опухолевых клеток. В процесс тканеспецифической локализации клеток вовлечены белки нескольких классов. Это молекулы адгезии, к которым относятся вещества семейства иммуноглобулинов, кальций-зависимых кадеринов и интегринов. Изменение экспрессии молекул адгезии играет важную роль в приобретении клеткой инвазивных или метастатических свойств. Кроме того, успешная колонизация клетками нового местоположения требует адаптации, которая достигается путем переключения спектра интегриновых субъединиц, что и наблюдается в мигрирующих опухолевых клетках. В результате возникают новые субтипы интегриновых молекул

с новыми субстратными предпочтениями. Попытки объяснить биологические эффекты интегринов в механистических терминах затрудняются существованием большого числа генов интегриновых субъединиц и еще большего числа гетеродимерных рецепторов, возникающего в результате комбинированной экспрессии различных субъединиц и соответственно сложных сигналов, испускаемых цитоплазматическими доменами этих рецепторов. Тем не менее, нет сомнений, что эти рецепторы играют важную роль в способности опухолевых клеток к тканевой инвазии и метастазированию. Также важнейшим фактором инвазивности и метастазирования являются экстраклеточные протеазы. Матрикс-деградирующие протеазы ассоциированы с клеточной поверхностью в соединении со специфическими рецепторами или интегринными. Протеазные гены активируются, гены ингибиторов протеаз подавляются, неактивные зимогенные формы протеаз превращаются в активные формы. Появление активных протеаз на клеточной поверхности облегчает инвазию опухолевых клеток в строму, через стенки кровеносных сосудов и сквозь слои нормальных клеток. Активация экстраклеточных протеаз и изменение специфичности связывания кадеринов, молекул адгезии и интегринов – основные моменты приобретения инвазивности и способности к метастазированию. Молекулярные механизмы, регулирующие эти события, различаются в различных тканевых средах.

Нарушение клеточной дифференцировки также характерно для многих опухолевых клеток, особенно при гемобластозах. Незрелость опухолевых клеток при лейкозах является не следствием нарушения дифференцировки зрелых клеток, претерпевших неопластическую трансформацию, а отражает происхождение опухоли из незрелых клеток, в которых блокированы процессы дальнейшей дифференцировки. Следует заметить, что это свойство не является универсальным: во многих типах опухолей наблюдается сохранение способности к дифференцировке, причем в отличие от лейкозов созревание клеток не препятствует приобретению злокачественного фенотипа. Примерами могут служить плоскоклеточный ороговевающий рак кожи и высоко-

дифференцированные аденокарциномы толстой кишки, происходящие из незрелых клеток, которые сначала несколько раз делятся, а затем дифференцируются.

Генетические механизмы опухолевой трансформации клетки

Установлено, что основными мишенями генетического воздействия при опухолевой трансформации являются два класса нормальных регуляторных генов: протоонкогены-промоторы (активаторы) роста клеток и канцеросупрессорные гены (антионкогены), тормозящие рост. Мутантные аллели (измененные состояния) протоонкогенов расцениваются как доминантные (преобладающие и препятствующие появлению других состояний), поскольку они трансформируют клетки, несмотря на наличие их нормальных копий. В противоположность этому обе нормальные аллели канцеросупрессорных генов должны быть повреждены для того, чтобы осуществилась трансформация. Поэтому такое семейство генов относят к рецессивным онкогенам (проявляющимся в гомозиготном состоянии, т.е. при наличии двух своих идентичных аллелей).

Поскольку в основе неопластической трансформации клеток лежат изменения в их геноме, к формированию злокачественных клеток могут приводить мутации, изменяющие генетический материал, либо реактивация «молчащих» эмбриональных генов, усиление или подавление функционирования «нормальных» генов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток, а также появление новых генов, как это наблюдается при вирусной индукции канцерогенеза. Гены, связанные с опухолевой трансформацией клеток, т.е. онкогены, в нормальных клетках представлены в виде протоонкогенов и функционируют как важные регуляторы жизнедеятельности клетки. Они кодируют молекулы, контролирующие и регулирующие клеточный рост, дифференцировку клеток, процессы проведения регуляторных (активационных и супрессирующих) сигналов внутрь клетки, процессы трансляции, нуклеинового обмена, апоптоза. Обычно одна популяция клеток продуцирует

ростовые факторы, а другая экспрессирует рецепторы к ним. В нормальных условиях эти процессы тщательно регулируются и тонко сбалансированы. Установлено, что повышенная продукция факторов роста или повышенная экспрессия рецепторов, их воспринимающих, способны приводить к повышенному и неконтролируемому клеточному росту. Другие продукты, кодируемые этой категорией протоонкогенов, участвуют в трансдукции сигнала с поверхности внутрь клетки (например, тирозинкиназы) и в процессах транскрипции (ДНК-связанные белки). Повышенная активность каждого из протоонкогенов способна стимулировать клеточный рост, а трансформация в онкоген приводит к потере контроля над клеточной пролиферацией.

К настоящему времени идентифицировано множество онкогенов (табл 11). В некоторых случаях канцерогенный эффект доминантных онкогенов связан с гиперпродукцией кодируемых белков, что характерно, в частности, для генов факторов роста. Однако чаще он обусловлен производством аномального продукта, обладающего новой агрессивной функцией. В общем случае, у мутантного белка появляется способность к передаче сигнала, индуцирующего клетку к делению, при отсутствии внешнего стимула. Это приводит к постоянной активации всей сигнальной цепи и неконтролируемому делению клетки. Причинами активации протоонкогенов при опухолях являются инсерционные мутации при вирусном воздействии; амплификация; точечные мутации, проявляющиеся в замене одного из оснований ДНК протоонкогена на другое; хромосомные перестройки (транслокации), сопровождающиеся в некоторых случаях реарранжировкой генов. В результате мутаций в структуре гена изменяется кодируемый белок, что отражается на его свойствах. В клетках при гемобластозах чаще всего наблюдается амплификация и связанное с ней повышение активности онкогена MYB, а высокий уровень экспрессии протоонкогена MYB проявляется в незрелых кроветворных клетках. Кроме этих механизмов активации клеточных онкогенов, характерных для большого количества опухолей человека, существует принципиаль-

но другой способ изменений генома, но который также приводит к опухолевой трансформации клетки.

Таблица 11 – Классы доминантных онкогенов

Протоонкогены	Типы нарушений	Опухоли
Гены факторов роста PDGFB, EGF, TGFA, TGFB, GDNF, INT2, HST1, NT1/WNT3, VEGF, FGFA, FGFB	амплификация, гипер- и/или эктопическая экспрессия	карциномы молочной железы, желудка и др.
Гены рецепторов факторов роста PDGFRB, PDGFRA, EGFR, HER2/NEU, RET, EPH, ELK, FMS, KIT, MET, ROS, SEA, TRK, VEGFR	амплификация, гипер- экспрессия, конститу- тивная индукция тиро- зин-киназной актив- ности	плоскоклеточные карциномы, глиобла- стомы, аденокарци- номы молочной желе- зы и яичников
Гены цитоплазматических сигнальных молекул 1. гены тирозинкиназ: SRC семейство (BLK, FGR, FYN, HCK, ICK, LYN, SRC, YES); CSK/CYL, FPS/FES ABL 2. гены серин/треонинкиназ: RAF/MIL, MOS, BCR, PIM1, AKT 3. гены G-белков: гетеротримерные (большие), мономерные (малые) RAS- семейство: NRAS, KRAS, HRAS, GSP	конститутивная ин- дукция тирозинки- назной активности; слияние с bcr - t (9;22) сайт-специфические мутации, амино- терминальное слияние конститутивная ин- дукция цАМФ- зави- симого киназного кас- када; нарушение связи с плазматической мем- браной	карциномы толстого кишечника, полипы острый лейкоз клеточные линии, карциномы желудка, опухоли слизистой нейробластомы, кар- циномы легких, тол- стого кишечника; опухоли поджелу- дочной железы
Гены ядерных транскрипци- онных факторов FOSB, FRA1, FRA2, JUNB, JUND, BCL3, EVI1, MYB, REL, ETS, TAL1, SKI, MYCL, MYCN	гиперэкспрессия, ам- плификация t(8;12), t(8;14), t(8;22)	нейробластомы, кар- циномы желудка, ки- шечника, яичников, легких; лимфома Беркитта
Гены антиапоптотических белков BAX, BCL2A, BCL2B	гиперэкспрессия, транслокации	фолликулярная В- клеточная лимфома

Согласно современным биологическим представлениям, в организмах присутствует часть наследственной информации, которая представлена мобильными генетическими элементами (структурами, которые являются фрагментами ДНК, способными встраиваться в различные точки клеточного генома). В частности, мобильными генетическими элементами являются ретровирусы, интегрирующиеся с геномом инфицируемой клетки. Изменения нуклеотидной последовательности ДНК нормальных клеток приводят к возникновению опухолевой клетки, которая приобретает новые свойства: способность к бесконечному количеству митозов, способность к метастазированию и способность активно противостоять системе иммунитета

Гены-супрессоры опухолевого роста в нормальной клетке оказывают инактивирующее влияние на процессы пролиферации и/или способствуют клеточной гибели, работая как сдерживающий механизм в течение G1 фазы клеточного цикла. В экспериментальных моделях оказана их способность осуществлять реверсию злокачественного фенотипа. Для проявления трансформирующего эффекта этих генов необходима инактивация обоих гомологичных аллелей, сопровождающаяся потерей функции.

В опухолевых тканях пациентов со спорадическими формами онкологических заболеваний, также как в раковых линиях клеток, часто присутствуют делеции областей локализации генов-супрессоров. Наличие таких делеций чаще всего идентифицируют с помощью генетического анализа состояния гипервариабельных микросателлитных маркеров, локализованных внутри рецессивных онкогенов или тесно сцепленных с ними. Высокая изменчивость микросателлитных маркеров по числу повторяющихся элементов в кластере приводит к тому, что большинство из них в норме находится в гетерозиготном состоянии. При возникновении делеции в области локализации микросателлитного маркера один из аллелей теряется, и при молекулярном анализе состояние подобного маркера может быть оценено как гомозиготное (явление «потери гетерозиготности»). Делеция одного из аллелей гена-супрессора часто сопровождается инактивацией оставшегося аллеля вслед-

ствие микромутации, метилирования регуляторных областей и т.д. В зависимости от функций, присущей генам-супрессорам опухолей, результатом их мутаций могут стать различные нарушения, приводящие к формированию опухолевого процесса.

Действие многих протоонкогенов и опухолевых супрессоров направлено на регуляцию комплексов циклин - циклинзависимая киназа, результатом чего служит нарушение управлением клеточного цикла. Белковые продукты протоонкогенов и опухолевых супрессоров повышают активность циклинзависимых киназ, ответственных за начальные этапы пресинтетической фазы и переход из G_1 в фазу синтеза ДНК. Кроме того, некоторые протоонкогены и опухолевые супрессоры регулируют активность циклинзависимых киназных комплексов с циклином А, требуемых для репликации ДНК, и с циклином В, необходимых для перехода из G_2 в митоз. Основным субстратом циклинзависимых киназных комплексов является опухолевый супрессор pRb и соответствующие ему белки p105 и p130. Супрессор pRb и его гомологи дефосфорилированы в неделящихся клетках и в пролиферирующих клетках, находящихся в ранней G_1 -фазе. В таком состоянии они связывают и блокируют транскрипционные комплексы с E2F, регулирующие активность ряда генов, продукты которых необходимы для прохождения S-фазы. Связывание белков семейства E2F с pRb ингибирует их транскрипционную активность. При митогенных сигналах, вызываемых ростовыми факторами, pRb в середине G_1 -фазы фосфорилируется циклинзависимым киназным комплексом с циклином D, что вызывает высвобождение транскрипционных факторов E2F из комплекса с pRb и их активацию. Одним из следствий этого процесса является стимуляция транскрипции гена циклина E. Таким образом, возникает регуляторная петля, поддерживающая активность транскрипционных факторов E2F и контролируемых ими генов, обеспечивающих репликацию ДНК. После завершения S-фазы pRb переходит в дефосфорилированное состояние, в котором он блокирует активность E2F и вход в следующую S-фазу (для ее инициации необходим новый митогенный стимул, активирующий циклинзависимый

мые киназные комплексы). Сходные реакции наблюдаются и при связывании интегринов (рецепторов, опосредующих адгезию клетки) с белками внеклеточного матрикса. Такое взаимодействие вызывает активацию и аутофосфорилирование киназы FAK (Focal Adhesion Kinase), в результате чего индуцируется рекрутирование адаптерного белка Grb2, активация Ras и MAP киназных каскадов.

Многие участники сигнальных путей, опосредующих в ответ на действие ростовых факторов активацию циклинзависимых киназ и, следовательно, стимуляцию клеточного деления, являются протоонкогенами. Изменения их структуры (мутации), приводящие к ускользанию от воздействия негативных регуляторных факторов и/или перманентному повышению экспрессии, превращают такие протоонкогены в онкогены. Продукты идентифицированных онкогенов представляют все этажи регуляции митогенного сигнала: ростовые факторы - PDGF-b (Sis), FGF1 и др.; рецепторные тирозинкиназы - EGF-R (ErbB), HGF-R (Met), Ret и др.; белки семейства Ras - K-Ras, H-Ras и N-Ras; эффекторы Ras - серин-треониновые киназы Raf и Mos; транскрипционные факторы - Jun, Ets1, Myc и др.; циклин D1. При детальном анализе в каждом новообразовании выявляются изменения хотя бы одного из компонентов сигнальных путей (протоонкогенов), вызывающие перманентную стимуляцию активности циклинзависимых киназ и инициацию клеточного деления вне зависимости от действия ростовых факторов. Таким образом, большинство известных протоонкогенов и опухолевых супрессоров тем или иным образом регулируют активность циклинзависимых киназ, ответственных за вход в S-фазу клеточного цикла. Продукты некоторых из клеточных (Mdm2) или вирусных (Т-антиген вируса SV40, E1A аденовирусов, E7 HPV и др.) онкогенов связывают и инактивируют основной субстрат циклинзависимых киназных комплексов pRb. По-видимому, нарушения в подобных сигнальных путях являются необходимыми для появления постоянно пролиферирующих неопластических клеток.

К третьему классу генов, также играющих важную роль в канцерогенезе, относят гены, контролирующие программированную гибель клеток - апоптоз. Функция одних из этих генов узкоспецифична и подчинена только указанной цели, но некоторые гены этой группы функционируют и как проонкогены, и как антионкогены.

Для неопластических клеток характерны также нарушения функции опухолевых супрессоров, осуществляющих позитивную регуляцию апоптоза. Например, развитие хронического миелоидного лейкоза обуславливается хромосомной транслокацией t(9;22), в результате которой образуется химерный ген BCR/ABL. Такая перестройка вызывает одновременно резкое увеличение тирозинкиназной активности белка ABL, что ведет к стимуляции митогенного и антиапоптотического сигналов, опосредуемых Ras-регулируемыми сигнальными путями, и инактивацию апоптогенных активностей ABL, обусловленных его участием в позитивной регуляции JNK, которая обладает способностью подавлять активность Bcl2 и активировать p53. Результатом другой хромосомной транслокации t(15;17), наблюдающейся в подавляющем большинстве случаев острого промиелоцитарного лейкоза, является соединение гена рецептора ретиноевой кислоты (RAR- α) с геном опухолевого супрессора PML, продукт которого образует в ядре специфические матрикс-ассоциированные тельца. Предполагается, что химерный белок PML/RAR- α инактивирует по доминантно-негативному механизму апоптогенную функцию нормального белка PML, образуя с ним гетеродимеры. В результате многонаправленного характера действия гибридных молекул появляются клетки с повышенным пролиферативным потенциалом и одновременно с устойчивостью к негативным регуляторным сигналам и/или неблагоприятным условиям окружающей среды. Предполагается, что такие изменения могут быть уже достаточными для развития по крайней мере некоторых форм гемобластозов. И, действительно, перестройки BCR/ABL или PML/RAR- α часто являются единственными генетическими изменениями,

обнаруживаемыми соответственно при хроническом миелоидном и остром промиелоцитарном лейкозах.

Регуляция клеточного цикла в процессе онкогенеза

Генетические aberrации приводят к нарушению функционирования различных белков, которые могут объединяться в комплексы активации или репрессии транскрипции РНК, меняя активность генов. Однако для синтеза белка важна не только скорость трансляции мРНК, но и ее стабильность, которая весьма эффективно контролируется микроРНК. Основные виды нарушений представляют собой геномные aberrации из числа мутаций, нарушающих регуляцию клеточного цикла и апоптоза. Кроме них важную роль в онкогенезе играют мутации, активирующие пути сигнальной трансдукции (процесса преобразования сигнала на пути от клеточной мембраны к ядру). Именно в изменениях компонентов цитоплазматических путей сигнальной трансдукции заключаются наиболее сложные механизмы приобретения клеткой пролиферативной автономии, которые получают и процессируют сигналы, испускаемые лиганд-активированными рецепторами ростовых факторов и интегринами.

В силу того, что такие нарушения специфичны для каждого типа опухоли, их принято считать рекуррентными. К компонентам сигнальной трансдукции относятся молекулы, воспринимающие сигнал на поверхности клетки (мембранные рецепторы), и разнообразные молекулы-эффекторы (исполнители), которые с помощью белок-белковых взаимодействий передают этот сигнал к ядру, активируя на конечном этапе специфичные факторы транскрипции. Рецептор и связанные с ним эффекторы формируют сигнальный путь (signalling pathway). Между разными сигнальными путями за счет использования идентичных эффекторов может происходить перекрестное соединение (интеграция сигналов), в результате чего в клетке образуются так называемые сигнальные сети (signalling network). Поэтому сигнальную трансдукцию можно представить как скоординированную эстафету, в которой

информация, полученная от внеклеточных сигналов, передается к внутриклеточным эффекторам, и далее - к ядру. Для успешного прохождения любого сигнала необходимо, чтобы все компоненты сигнального пути были собраны в нужном месте и именно в то время, когда это необходимо. Поэтому разные клетки (или одна и та же клетка, но в разное время) будут по-разному реагировать на сигналы одинаковой интенсивности. Чувствительность клетки к уровню интенсивности сигнала, т. е. к концентрации лиганда в окружающей среде, зависит от количества и стабильности рецепторных комплексов на ее поверхности. Основные типы мембранных клеточных рецепторов по их биологической функции можно условно разделить на две группы: рецепторы, индуцирующие сигналы выживания и пролиферации клеток и рецепторы, индуцирующие клеточную дифференцировку. После того как рецептор связался с лигандом, для передачи сигнала необходимо, чтобы внутри клетки были надлежащим образом собраны комплексы эффекторов, передающих сигнал в ядро. Связывание лиганда с рецепторами вызывает клеточный ответ в виде генной экспрессии. Ростовые факторы индуцируют экспрессию специфических групп генов через трансцитоплазматические сигнальные пути, регулирующие транскрипцию. Простейшим механизмом передачи сигнала через цитоплазму в ядро является система PKA/CREB. В этом сигнальном пути цАМФ, чей уровень повышается в ответ на рецепторную стимуляцию, активирует протеинсеринкиназу PKA, локализованную в цитоплазме, связывается с ее регуляторными субъединицами и высвобождает каталитические субъединицы, которые перемещаются в ядро. С-субъединица входит в ядро и фосфорилирует транскрипционный фактор CREB, который является ядерной мишенью PKA. Фосфорилирование обуславливает связывание CREB с коактиватором CBP/p300 и транскрипцию цАМФ-зависимых генов. Многие транскрипционные факторы известны теперь как непосредственно регулируемые фосфорилированием через позитивный или негативный контроль ядерного экспорта или импорта, связывание с ДНК или трансактивацию. Молекулярные механизмы всех процессов сигнальной трансдукции сводятся к спе-

цифическим межпротеиновым взаимодействиям, которые осуществляются путем гомо- или гетеродимеризации белков и образования протеиновых комплексов. Путь сигнальной трансдукции представляет собой каскад белков-трансммиттеров, которые передают сигнал от предыдущего протеина к следующему. Биохимические последствия сигнальной трансдукции заключаются в изменении состояния белков и/или последовательной ферментативной активации каскада протеинкиназ. Передача сигнала осуществляется чаще всего фосфорилированием белка-мишени по тирозину, серину или треонину. Конечной целью всех путей сигнальной трансдукции является достижение ядра, модификация генной транскрипции и изменение поведения клетки. Выбор пути сигнальной трансдукции зависит от внутри- и внеклеточной ситуации: совокупности действующих факторов, стадии дифференцировки, момента клеточного цикла, электролитного баланса и доступности метаболитов. В онкологическом контексте стоит акцентировать внимание на описании молекулярных механизмов, ответственных за передачу митогенных сигналов, регулирующих клеточный цикл и пролиферацию. Поливариантность сигнальной трансдукции обеспечивается возможностью перекрестной передачи сигнала с одного пути на другой и существованием родственных высокомолекулярных белков с модульной (доменной) структурой, которые могут отличаться друг от друга по структуре наличием или отсутствием функциональных доменов. Для передачи регуляторных сигналов в геноме человека закодировано более 650 протеинкиназ, и около 20% этого количества составляют протеинтирозинкиназы. При этом большинство протеинтирозинкиназ играют важную роль в трансмембранном сигнале в ответ на воздействие лигандов, которые связываются с поверхностными клеточными рецепторами. Роль экстраклеточных лигандов в индукции и регуляции клеточных метаболических ответов играют гормоны, цитокины и другие ростовые факторы.

В системе сигнальной трансдукции выявляется определенная закономерность. На «входе» в систему существует множество лигандов и их рецепторов (более 200 видов), а на «выходе» из системы активируется несколько

сотен факторов транскрипции, которые имеют своей мишенью около 20 тыс. генов. При этом именно в верхней и нижней области сигнальной трансдукции сосредоточены белки, кодирующие гены которых наиболее часто подвергаются абберациям при лейкозах. Одной из причин такого эффекта может служить большое количество потенциальных опухолеродных мишеней в верхней и нижней частях сети сигнальной трансдукции. В средней части сети сигнальной трансдукции, отвечающей за модулирование и разнообразие ответов и использующей многочисленные типы рецепторов, имеется на порядок меньше потенциальных мишеней. На сегодняшний день известно всего около 30 внутриклеточных сигнальных путей, которые совместно используются рецепторами разных типов. В цепи сигнальной трансдукции область передачи сигнала от рецептора к факторам транскрипции имеет ограниченное количество эффекторов. В то же время, именно на этом участке сигнализации (участок основного процесса (core process) или критический узел (critical nodes)) осуществляется формирование разнообразия клеточных ответов на внеклеточные сигналы. Ограниченное число эффекторных молекул компенсируется большим количеством их комбинаций на адапторных (вспомогательных) белках, которые содержат стыковочные сайты и выполняют работу по сближению в пространстве и времени различных эффекторных белков сигнальной трансдукции для эффективного прохождения сигнала от клеточной мембраны к ядру. Тот факт, что именно адапторные белки определяют специфичность сигнальной трансдукции, был подтвержден экспериментальными исследованиями, где с помощью генно-инженерных манипуляций были получены искусственные химерные гены белков-эффекторов. В этих белках были соединены части молекул, отвечающие за активацию определенного набора факторов транскрипции, со стыковочными доменами белков-эффекторов из других сигнальных сетей. Получилось, что созданные химерные гены кодировали эффекторные белки, у которых каталитическая активность оставалась неизменной, но стыковаться они могли только с «чужими» адапторными белками. Введение таких генов в клетки дрожжей приводило к

формированию «неправильных» комплексов на адапторных белках, что вызвало изменение клеточного ответа на анализируемую внешнюю стимуляцию.

Основным типом модификации белков сигнальной трансдукции является их фосфорилирование и дефосфорилирование. В зависимости от участка протеина, подвергаемого фосфорилированию, эта реакция может вызвать как активацию белка, так и его ингибирование. Кроме того, фосфорилированные аминокислотные остатки часто служат стыковочными сайтами для других белков. Фосфорилирование происходит по остаткам аминокислот, содержащих гидроксильную группу (тирозин, серин и треонин), и протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование белков, подразделяются на тирозиновые и серин-треониновые (как правило, их называют «киназы»). Протеинкиназной активностью обладают многие клеточные рецепторы, которые относят к группе рецепторных протеинкиназ. Процессы дефосфорилирования белков осуществляются протеинфосфатазами, которые также делятся на тирозиновые и серин-треониновые фосфатазы, в зависимости от того, какой аминокислотный остаток они дефосфорилируют. Фосфатазы, связанные с клеточной мембраной, относят к группе рецептор-подобных (receptor-like) протеинфосфатаз. Кроме фосфорилирования сигнальные белки иногда подвергаются гидролизу, как, например, Notch рецепторы. Но значительно чаще модуляция активности сигнальных белков осуществляется с помощью их убиквитинирования. Для эффективного прохождения сигнала от клеточной мембраны к ядру необходимо, чтобы различные эффекторные белки сигнальной трансдукции, поочередно активирующие друг друга фосфорилированием (так называемый «киназный каскад»), были сближены в пространстве и времени. Такую работу выполняют различные адапторные белки, которые содержат стыковочные сайты (как правило, представляющие собой фосфорилированные остатки аминокислот в окружении определенного набора других аминокислот), специфичные для связывания нескольких сигнальных белков.

Таким образом, протеинкиназы являются важнейшими регуляторами путей сигнальной трансдукции, поэтому их активность обычно строго контролируется и регулируется. Почти любое нарушение в системе протеинкиназной сигнализации, происходящее в результате генетических изменений, приводит к нарушению регулировки их активности и инициации злокачественной трансформации клетки. Основным механизмом трансмембранной и внутриклеточной передачи ростового сигнала является тирозинфосфорилирование. Открытие EGF-стимулированного фосфорилирования рецептора EGF по тирозину привело к идентификации большого семейства лиганд-стимулируемых рецепторных протеинтирозинкиназ, которые обладают внутриклеточной каталитической активностью, активируемой связыванием с лигандом. Рецепторы, ассоциированные с протеинкиназной активностью, подразделяют на 3 основные группы.

Первую группу формируют тирозинкиназные рецепторы (RTKs, receptor tyrosine kinases), цитоплазматическая часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Лигандами RTKs обычно являются различные факторы роста. Активация цитоплазматического каталитического домена рецепторной RTK и поверхностных рецепторов других типов происходит вследствие лиганд-индуцированной ди- или олигомеризации, в результате которой каждый каталитический домен трансфосфорилирует тирозин в активационной петле другого каталитического домена. Затем происходит аутофосфорилирование тирозина вне каталитического домена, которое является ключом к дальнейшей передаче сигнала.

Вторая группа представлена рецепторами цитокинов, которые не обладают собственной киназной активностью, но их цитоплазматический домен содержит стыковочные сайты для связывания с нерецепторными JAK (Janus kinase) тирозинкиназами, которые и производят фосфорилирование эффекторных белков при стимулировании рецептора. JAK киназы, в отличие от других протеинкиназ, имеют 2 киназных домена, хотя активен только один из них. Через JAK-семейство рецептор-ассоциированных тирозинкиназ пере-

дают свои регуляторные сигналы, в первую очередь, цитокиновые рецепторы без внутриклеточной киназной активности, например IL-3, GM-CSF и интерферонов. Отмена цитокиновой зависимости часто связана с опухолевой трансформацией и ассоциирована с аутокринной экспрессией ростовых факторов. Основной мишенью JAK киназ является семейство цитоплазматических факторов транскрипции STAT (signal transducer and activator of transcription), которые после активации перемещаются в ядро и активируют транскрипцию своих генов-мишеней.

Третью группу составляют рецепторы трансформирующего фактора роста β , цитоплазматическая часть которых обладает серин-треонин киназной активностью. TGF- β рецепторы активируют цитоплазматические факторы транскрипции SMAD (similar to mothers against decapentaplegic), которые могут, как и STAT, активировать в ядре транскрипцию определенных генов-мишеней или взаимодействовать в цитоплазме с эффекторами других путей сигнальной трансдукции (интеграция сигналов).

Активность протеинкиназ подвергается в клетках строгому контролю и «самоконтролю», и при отсутствии внешнего воздействия они находятся в состоянии аутоингибирования. Для активации цитоплазматических протеинкиназ большое значение имеет их окружение. В клетке наибольший «уровень» протеинкиназной активности сосредоточен в областях инициации сигнальной трансдукции, т. е. в участках, соседствующих с мембранными микродоменами, несущими рецепторы. Именно в этих цитоплазматических компартментах клетки концентрируется наибольшее число различных протеинкиназ и адапторных белков, готовых к взаимодействию друг с другом при стимуляции рецепторов. Для того чтобы попасть в эти компартменты и активироваться, многим протеинкиназам необходимо претерпеть модификацию и приобрести «якорь», который направит их к активным мембранным участкам. Активное состояние рецептора после взаимодействия с лигандом недолговечно. Специфичный липидный состав мембранных микродоменов рецепторов и локально повышенная киназная активность вокруг активированных

рецепторов приводят к рекрутированию в эти компартменты различных белков, служащих сигналами к эндоцитозу (интернализации рецепторов). Надо отметить, что даже в эндосомах многие рецепторные комплексы продолжают активно индуцировать пути сигнальной трансдукции, а некоторые рецепторы, например EGFR (epidermal growth factor receptor), даже попадают в ядро. Но в итоге весь этот сложный белковый комплекс сигнальной трансдукции подвергается деградации в 26S протеосомах.

Важную роль в сборке и функционировании мультикомпонентных комплексов сигнальной трансдукции играют и межпротеиновые взаимодействия, которые осуществляются посредством нескольких структурных компонентов, часто встречающихся в молекулах сигнальных протеинкиназ, а также адапторных белков, не имеющих каталитической функции. К наиболее распространенным структурам сигнальных белков относятся домены SH1, SH2 и SH3 (Src homology). Белки, лишенные каталитической активности (киназного домена SH1), но содержащие интактные домены SH2 и SH3, обладают трансформирующей способностью. Функциональные последствия связывания с SH-доменами заключаются в привлечении и активации адапторных белков и протеинкиназ, а также определение их клеточной локализации. Многие адапторные белки содержат несколько SH2- и SH3-доменов, благодаря которым они могут участвовать в сборке мультивалентных сигнальных комплексов в ответ на активацию рецепторов, ассоциированных с тирозинкиназной активностью.

Существуют также пути сигнальной трансдукции, индуцированные рецепторами, связанными с G-белками (GPCRs, G protein-coupled receptors). Эти змеевидные рецепторы, цитоплазматический домен которых ассоциирован с «заякоренными» на мембране G-белками (активируются гуанозинтрифосфатом), в основном связаны с проводящими путями вторичных посредников, включая цАМФ и IP₃/DAG. Лигандами GPCRs являются многие гормоны (глюкагон, серотонин, вазопрессин, АКТГ и т. п.) и хемокины. При лейкозах рекуррентные aberrации затрагивают другой класс G-белков – малые G-

белки, к которым относятся протеины семейства RAS. Эти небольшие белки (20–35 КДа), состоящие из одной субъединицы, имеют очень много функций в клетке и взаимодействуют с большим количеством других белков. G-белки находятся в активном состоянии, когда они связаны сгуанозинтрифосфатом, и в этом состоянии принимают активную конформацию, позволяющую им взаимодействовать друг с другом и активировать другие белки (в частности, белки-эффекторы сигнальной трансдукции). Так как G-белки, в особенности онкобелки RAS, обладают огромным онкогенным потенциалом, то природа позаботилась о строгом контроле их активности. Во-первых, как и протеинкиназы, они обладают мощным «самоконтролем», который заключается в том, что они являются гуанозинтрифосфатазами и могут самостоятельно инициировать процессы гидролиза и переходить в неактивное состояние. Кроме этого, существует большое число ферментов, которые регулируют активность G-белков. Степень активности RAS белков зависит от баланса между активностями GEFs и GAPs. Так как GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors, факторы обмена гуаниловых нуклеотидов) и GAPs (GTPase Activating Proteins, белки-активаторы ГТФазной активности) модулируют активность потенциальных онкобелков (RAS), то с точки зрения онкологии GEFs можно отнести к онкогенам, а GAP - к генам-супрессорам опухоли. Совместная локализация RAS, GEFs, GAPs и эффекторных белков является ключевым условием для RAS-зависимой сигнальной трансдукции. Большое значение для ее реализации имеют посттрансляционные модификации RAS. Мутации в RAS-генах наблюдаются почти в 30 % злокачественных неоплазий. При этом можно наблюдать стандартность этих мутаций. Так, во всех мутантных RAS-белках, которые обнаруживаются в ретровирусах (где онкогены RAS были впервые идентифицированы) и в клетках пациентов с онкопатологией в крупных мультицентровых исследованиях выявляется один и тот же набор активирующих мутаций, затрагивающий 12, 13 и 61-й кодоны онкогена. Подобные мутации приводят к постоянной активации RAS-белка и инициируют онкогенез.

Помимо регуляции процессами сигнальной трансдукции циклинзависимые киназы осуществляют координацию клеточного цикла через фазы роста и синтеза. Эти клеточные механизмы также управляются процессами фосфорилирования/дефосфорилирования, которые промотируются киназами. Совокупность различных сигнальных и регуляторных молекул играет роль координирующего механизма клеточного цикла. В настоящее время принята классификация циклинов в соответствии с их участием в определенной фазе клеточного цикла: D1, D2 и D3 (циклины фазы G₁), A и E (циклины S-фазы), B1 и B2 (циклины фазы G₂/M). В нормальной клетке циклиновые субъединицы существуют в виде четырехмерных комплексов, содержащих также ядерный антиген пролиферирующей клетки (PCNA – proliferating cell nuclear antigen). Идентифицированы два семейства ингибиторов циклинзависимых киназ: семейство INK4 (белки p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}, связывающие циклин-D-зависимые киназы Cdk4 и Cdk6) и семейство CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} и p57^{KIP2}). Ассоциация соответствующего количества этих ингибиторных молекул с циклиновым комплексом снижает киназную активность. В норме эти молекулы действуют совместно в ответ на сигналы остановки клеточного цикла. В опухолевых клетках все эти структуры мутационно повреждены, а циклиновые комплексы разрушены. При различных неопластических процессах встречаются реаранжировки, амплификации или гиперэкспрессия циклиновых генов, а также повышенный уровень мРНК или белка циклинзависимых киназ. В результате опухолевые клетки проходят через стадии клеточного цикла, несмотря на неподходящие условия. Нарушение регуляции клеточного цикла является отличительным признаком злокачественной опухоли.

Как известно, клеточная пролиферация и дифференцировка представляют собой взаимоисключающие феномены, поэтому в норме клетки, коммитированные на путь дифференцировки, прекращают клеточное деление. Активность механизма регуляции клеточного цикла контролируется присутствием упомянутых выше ингибиторов, которые могут останавливать про-

грессию клеточного цикла в определенных критических точках. Эти ингибиторы называют «опухолевыми супрессорами», и отсутствие их экспрессии или потеря активности проявляется в процессе канцерогенеза. Так, низкая экспрессия p21 и наличие p53-дефицитных клеток регистрируются при промиелоцитарном лейкозе, бластном кризе хронического миелолейкоза, остеосаркомах, гепатобластомах и многих видах рака.

Поскольку на клеточном уровне существует комплекс молекулярных путей восприятия генетических повреждений и ответа на них, мутации на этих этапах могут привести к опухолевой прогрессии. Существуют гены, которые интегрируют правильное восприятие средовых сигналов и соответствующий клеточный ответ. В клетках млекопитающих такую интегральную функцию выполняет ген p53, который называют «хранителем генома» (guardian of the genome). Это наиболее известный супрессор опухолей и ключевой элемент механизма, позволяющего остановить клеточный цикл в неблагоприятных условиях и предотвратить появление резистентных опухолевых клонов. В норме ген p53 получает информацию о повреждении ДНК и запускает каскад событий, приводящих к остановке роста. Повреждения ДНК обуславливают быстрое накопление белка p53 в клетке и индуцируют регуляторные или контролируемые механизмы, блокирующие клеточный цикл. По завершении репарации блок снимается и клеточное деление может продолжаться. Клетки, имеющие мутации p53, вынуждены входить в клеточный цикл с поврежденной и нерепарированной ДНК, так как отсутствие продукта гена p53 дестабилизирует геном. В норме белок p53 живет приблизительно 20 минут, а мутантный p53 – от нескольких часов до дней и накапливается в ядрах опухолевых клеток, что дает возможность иммуногистохимического окрашивания специфическими антителами. Приблизительно 50% первичных злокачественных опухолей человека несут мутации p53, при этом опухоли с мутантным p53 клинически более агрессивны. Ген p53 действует как сенсор повреждения ДНК и индуцирует репарацию, но если повреждение существенно и необратимо (нерепарабельно), он направляет клетку по пути

апоптоза, чтобы предотвратить размножение клетки, имеющей мутацию. Способность индуцировать апоптоз является важной составляющей его опухолесупрессорной функции. P53 активирует экспрессию генов-супрессоров опухолей p21^{WAF1}, Вах и Fas и подавляет экспрессию гена Bcl2. Получив информацию о повреждении ДНК, белок p53 активирует транскрипцию гена p21, продуцирующего белок – ингибитор циклинзависимых протеинкиназ. Повышение уровня белка p21 ингибирует фосфорилирование, способствующее прогрессии клеточного цикла. Очевидно, что потеря функции p53 проявляется в отсутствии транскрипционной активации p21 и последующего ингибирования прогрессии клеточного цикла.

Многие мутации дают эффект прерывания остановки роста (активация онкогенов и инактивация онкосупрессии). Мутации, инактивирующие ген p53 и его регуляцию гена p21, будут иметь эффект отмены контроля клеточного цикла. Мутации p53-зависимого пути могут проявляться одинаково: потерей ответа на негативные ростовые сигналы. В этот путь сигнальной трансдукции вовлечены многие другие гены. Функция самого p53 также регулируется на многих уровнях. Она может изменяться мутациями самого гена и мутациями пути метаболизма белка p53, например, фосфорилирования, мутациями, влияющими на степень и длительность экспрессии, локализацию и конформацию белка. Существует такой же многоступенчатый контроль сборки и функционирования циклиновых комплексов. Их транскрипция и трансляция находятся под сложным и жестким контролем. Циклинзависимые киназы активируются и инактивируются путем фосфорилирования/дефосфорилирования. Ассоциация белков в четырехмерные комплексы также управляется дополнительными белками. Все эти процессы играют важную роль в контроле критических точек клеточного цикла.

Одним их важнейших регуляторов клеточного цикла, играющих весомую роль в онкогенезе, является также трансформирующий ростовой фактор β , который может индуцировать рост-ингибирующий эффект в одних клетках и стимулировать пролиферацию других. Стимулирующий эффект TGF β не-

прямой, а через экспрессию иных эндогенных ростовых факторов, таких как PDGF (ростовой фактор соединительной ткани) или через повышение экспрессии рецепторов EGF (эпидермального фактора роста). Остановку роста, напротив, TGF β индуцирует непосредственно и коррелирует с поддержанием опухолесупрессорного белка Rb в гипофосфорилированном состоянии. В большинстве клеток TGF β проявляет рост-ингибирующую активность посредством блокирования функции циклинов A и E и Cdk2/4, а также фосфорилирование Rb, в результате чего клеточный цикл останавливается в G₁-фазе. TGF β может также супрессировать экспрессию онкогена c-Myc, блокируя таким образом прохождение клеткой фазы G₁, и стимулировать перераспределение свободного и связанного с циклиновыми комплексами p27^{CIP1}. При этом TGF β индуцирует конкурентное связывание p15 с Cdk4/6 и, следовательно, ингибирует функцию последних. Семейство TGF β состоит из 3 изоформ с различной тканевой специфичностью. Основным источником TGF β являются тромбоциты и клетки костной ткани, однако также его способны секретировать активированные лимфоциты, макрофаги и нейтрофилы. TGF β является важнейшим регулятором гемопоэза и иммунного ответа, регулирует пролиферацию и дифференцировку ранних предшественников, но не влияет на более зрелые клетки. Относительно злокачественного роста, влияние TGF β варьируемо и зависит от степени потери чувствительности клеток к нему, которая колеблется от нормальной до полной резистентности даже в пределах одного типа опухоли, поскольку TGF β -сигналинг зависит от различных генов-мишеней в разных клеточных типах, от вида активирующихся и репрессивных генов, от вариации утраченных ответов в опухоли. Клеточная пролиферация зависит от упразднения не только цитостатических антиростовых сигналов, но и сигналов, принуждающих клетки к необратимому вхождению в постмитотическое состояние готовности к дифференцировке, механизмы которого не вполне изучены. По всей видимости, опухолевые клетки используют различные стратегии избегания терминальной дифференцировки. Это может быть непосредственное вовлечение гена c-Myc,

который кодирует транскрипционный фактор, или другой путь нарушения взаимодействия основного механизма клеточного цикла с различными антипролиферативными и индуцирующими дифференцировку сигналами.

Процессы апоптоза и злокачественной неоплазии

Изучение механизмов опухолевой прогрессии привело исследователей к выводу, что канцерогенез зависит не только от пролиферативной активности опухолевого клона, но и от его возможности избежать регулируемой клеточной гибели. Так поиски универсальных маркеров опухолевой прогрессии оказались связаны с явлением апоптоза, которое служит генетически запрограммированным защитным механизмом. Этот процесс обеспечивает определенный по времени жизненный цикл клетки и при измененных физиологических или патологических условиях включает программу ее гибели, направленную на запуск самоуничтожения, что касается, в первую очередь, патологически измененных, мутировавших клеток. Апоптоз представляет собой процесс элиминации лишних клеток в ходе развития, в поддержании гомеостаза, а также аутореактивных иммунных клеток, клеток с нерепарабельными повреждениями или представляющих по какой-либо причине угрозу для организма. Подобно циклу клеточного деления, механизмы апоптоза являются комплексной сетью блокаторов и индукторов клеточной смерти, действующих разнонаправленно в тонком равновесии для достижения надлежащего тканевого гомеостаза. Посредством процесса апоптоза, который имеет ряд биохимических и морфологических признаков, внутренние или внешние факторы, активируя генетическую программу, приводят к гибели клетки и ее эффективному удалению из ткани. Биохимические изменения при апоптозе характеризуются активацией нелизосомных эндогенных эндонуклеаз, которые включают специфическое расщепление ядерной ДНК в межклеточных участках, рибосомальной РНК и белков на фрагменты, повышение внутриклеточного уровня ионов кальция, снижение митохондриального трансмембранного потенциала и высвобождение цитохрома С из митохон-

дрий в цитоплазму, выделение фосфатидил-серина из внутренней плазматической мембраны в наружный монослой, активацией цистеиновых протеиназ (каспаз), образованием активных форм кислорода. Морфологически апоптоз характеризуется сжатием клетки, конденсацией хроматина, формированием в цитоплазме полостей и апоптотических телец, фрагментацией ДНК и изменением мембраны клетки. В итоге клетка фрагментируется и подвергается фагоцитозу без воспалительной реакции и рубцевания ткани.

Известно, что способность уходить от апоптотического ответа с помощью тех или иных приспособительных механизмов является обязательным атрибутом любой растущей опухоли. А нарушение молекулярных механизмов апоптоза может ключевым образом менять гомеостаз и принимать участие в процессе онкогенеза. Описано несколько механизмов резистентности клеток к апоптозу, индуцируемому Fas и другими рецепторами смерти: мутации в генах, кодирующих рецепторы; подавление экспрессии рецепторов; дефекты в путях апоптотической сигнальной трансдукции. DED-содержащие ингибиторы передачи сигналов рецепторов смерти идентифицированы у человека и других млекопитающих, а также у вирусов. Один из таких антиапоптотических белков, с-FLIP/FLAME, является гомологом каспаз 8 и 10 и содержит DED, но лишен протеолитической активности. FLIP и другие антиапоптотические белки DED-семейства конкурируют с каспазами, вовлеченными в TNF-сигналинг, за связывание с белком FADD/MORT1 и, следовательно, функционируют как трансдоминантные ингибиторы этих каспаз. Повышенная экспрессия белка FLIP ассоциируется с Fas-резистентностью в опухолях некоторых типов. Развивающаяся по механизму Fas-L/Fas резистентность дает опухоли ряд преимуществ. Во-первых, она позволяет опухолевым клеткам избегать цитотоксического действия T-клеток и естественных киллеров, которое обусловлено экспрессией на их поверхностной мембране Fas-лиганда и индукцией апоптоза в клетках-мишенях. Во-вторых, она позволяет опухолевым клеткам экспрессировать Fas-лиганд на собственной поверхности, не убивая при этом самое себя по аутокринному механизму Fas-

L/Fas. Это так называемая опухолевая контратака, ответственная за индуцированную опухолью гибель иммунных клеток, которая создает бреши в Т-клеточном ответе, уничтожая любые активированные Т-хелперы, в том числе способные распознавать опухолевые антигены. В-третьих, экспрессия Fas-лиганда может также быть основным способом мигрирующих опухолевых клеток расчистить себе путь от других, нормальных, клеток. Кроме того, в некоторых типах опухолевых клеток цитостатики индуцируют апоптоз, усиливая экспрессию Fas или других лигандов и рецепторов семейства TNF, доставляя апоптозный сигнал через аутокринный механизм. Следовательно, резистентность к сигналам рецепторов смерти наделяет опухолевые клетки химиорезистентным фенотипом. Интересно, что опухолевый супрессор p53 усиливает транскрипцию Fas и DR5, таким образом, становится понятной связь между рецепторами смерти и этим апоптоз-индуцирующим геном.

К настоящему моменту довольно хорошо изучены молекулярные механизмы апоптотической клеточной гибели. Ведущим из них является митохондриальный путь, реализуемый посредством белков семейства Bcl-2. При развитии митохондриального пути апоптоза критическим событием является транслокация проапоптотического белка Bax из цитоплазмы в митохондрии. Данное событие сопровождается снижением потенциала митохондриальной мембраны, выходом цитохрома c (образующего комплекс с белком Araf-1 и про-каспазой 9) из митохондрий и активацией каспаз-опосредованного апоптотического каскада. Семейство белков Bcl-2, куда входят как антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), так и проапоптотические (Bax, Bad) белки, играет ключевую роль в регуляции окислительно-восстановительного статуса митохондрий. Общеизвестно, что баланс между этими двумя типами белков, в частности между белками Bax и Bcl-2, является определяющим фактором конечного апоптотического ответа и клеточной выживаемости. Однозначно доказано, что в опухолевых клетках, данное соотношение (а следовательно, и опосредуемые данными белками функции) нарушено в сторону увеличения экспрессии и/или активности антиапоптотических и, соответ-

ственно, уменьшения экспрессии и/или активности проапоптотических белков. В результате этого опухолевые клетки становятся устойчивыми к апоптотической гибели. В многочисленных независимых исследованиях было установлено, что при раке простаты имеет место 30%-ная гиперэкспрессия белка Bcl-2, которая коррелирует с агрессивностью поведения опухоли и плохим прогнозом. Добавление к опухолевым клеткам антисмысловых олигонуклеотидов или блокаторов транскриптов (si-РНК), специфических для Bcl-2 и Bcl-xL, приводило к повышению экспрессии Bax и индукции апоптоза.

В последние годы появились данные о том, что в реализации ИЗС-индуцированного апоптоза задействованы также компоненты PI3K/Akt-сигнального каскада – одного из возможных путей передачи сигналов, индуцируемых полипептидными ростовыми факторами (EGF). Ключевым эффектором данного каскада является ядерный фактор транскрипции NF- κ B – важнейший сигнальный белок, определяющий клеточную выживаемость и активирующий транскрипцию большого числа антиапоптотических генов. Однако поскольку киназа Akt является ингибитором целой группы проапоптотических белков, опосредующих митохондриальный (белки Bad, MDM2), FAS-лиганд-зависимый механизмы или одновременно несколько путей апоптоза, следует признать, что PI3K/Akt-сигнальный каскад может блокировать митохондриальный апоптоз (т.е. быть его вышестоящим регуляторным механизмом) и что все пути апоптотической клеточной гибели тесно взаимосвязаны между собой. Это значит, говорить о влиянии того или иного индуктора апоптоза только на какой-то один апоптотический механизм не вполне корректно. В качестве доказательства этого утверждения показано, что активация транскрипционной активности NF- κ B тормозит процессы программированной клеточной гибели, вызываемой TNF и другими внеклеточными стимулами. Кроме того, NF- κ B блокирует активность эффектора апоптоза - каспазы 8 - и является антагонистом проапоптотического белка p53, являющегося супрессором опухолевого роста. Есть данные, что антиапоптотические

функции NF-κB осуществляются также путем контролируемой им активации экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xl, т.е. экспрессия белков, опосредующих митохондриальный апоптоз, напрямую контролируется фактором NF-κB.

В ряде работ было показано вовлечение в индуцированный извне апоптоз опухолевых клеток дополнительных сигнальных механизмов, протекающих, в частности, с участием стресс-активируемого c-JNK-киназного (c-JunN-terminalkinase) каскада и митоген-активируемых протеинкиназ. Важным молекулярным маркером апоптоза (индуктором которого является клеточное ядро) считается также проапоптотический белок p53 – продукт онкосупрессорного гена, который, как и в вышеописанных случаях, активирует цистеиновые протеиназы. Известно, что белок p53 может быть активирован посредством нерепарабельного разрыва молекулы ДНК, а его утрата клеткой ведет к повышению скорости опухолевого роста.

Из ключевых молекулярных мишеней апоптоза, следует сказать еще об одной группе белков-ингибиторов апоптоза – белках группы IAP (inhibitor of apoptosis protein). В последнее время IAP-белки все больше начинают интересовать исследователей, занимающихся темой апоптоза, в силу плеiotропности и важности выполняемых ими в клетке функций, а именно, их особой роли в регуляции баланса между клеточной пролиферацией/дифференцировкой и апоптозом. Наиболее известный (и самый низкомолекулярный, 16,5 kDa) из белков данной группы – белок сурвивин (от англ. survive – выжить) - практически не экспрессируется в нормальных тканях, за исключением эмбриональных и быстрообновляющихся (слизистая кишечника) клеток. В то же время повышенная экспрессия сурвивина отмечается во многих злокачественных опухолях. Более того, ген сурвивина входит в число генов с наибольшей гиперэкспрессией в опухолях человека. Гиперэкспрессия сурвивина при злокачественных новообразованиях ассоциируется с повышенной агрессивностью опухолевого фенотипа и лекарственной устойчивостью. Получены экспериментальные доказательства того, что

активатором транскрипции гена сурвивина является ядерный фактор NF- κ B, а мишенями сурвивина, прямое взаимодействие с которыми приводит к ингибированию их протеазной активности и, как следствие, к подавлению апоптоза, являются каспазы 3 и 7. Сурвивин функционирует как своеобразный «пропускной пункт» клеточного цикла, дающий разрешение на апоптотическую элиминацию генетически нестабильных клеток.

При изучении параметров апоптоза, которые можно было бы использовать в качестве прогностических и определяющих терапию маркеров, были выделены p53 и Вах. Так, факторами неблагоприятного прогноза и высокого риска метастазирования у пациентов, радикально оперированных по поводу рака желудка, явились наличие экспрессии p53 и отсутствие экспрессии Вах в опухолевых и стромальных клетках. Также одним из вариантов гибели клеток инфильтрата в легких при лимфангоэктазии является апоптоз, который можно рассматривать как один из патогенетических механизмов, определяющих характер течения процесса. Программированная клеточная гибель способна ограничивать площадь инфильтрата и обуславливать регресс заболевания. А отражением интенсивности программированной клеточной гибели при лимфангоэктазии являются индекс Вах/bcl-2 и активность цистеиновых протеиназ.

Таким образом, в последние годы в связи с развитием молекулярной биологии, клинической иммунологии, биофизики, цитогенетики значительно расширились представления о механизмах прогрессирования опухолевых болезней, что дает возможность разрабатывать новые направления изучения данной патологии для определения критериев ранней диагностики и прогноза. При злокачественных новообразованиях крови неопластический клон доминирует в результате прогрессирования заболевания, а на начальной стадии патологические и нормальные клеточные линии одинаково активны, что способствует сохранению гемопоэза. Конечным процессом механизма, контролирующего появление атипичных клеток, является их апоптоз. В процессе онкогенеза большое значение имеют иммунологические и метаболические

нарушения, приводящие к утрате контроля над неопластическими изменениями гемопоэтических клеток. Возможным инициатором генетической нестабильности, ведущей к клоновому процессу при заболеваниях крови, являются нарушения взаимодействия факторов, управляющих процессом программированной клеточной гибели. Поэтому представляется актуальным на сегодняшний день раскрытие механизмов и определение критериев формирования сигнала апоптоза для разработки эффективной оценки реализации сигнала клеточной гибели при опухолевых заболеваниях крови. Известно, что действие многих традиционных противоопухолевых и противовирусных препаратов направлено на прямую или опосредованную активацию механизмов апоптотической клеточной гибели – уничтожение трансформированных и/или вирусинфицированных клеток. Таким образом, избирательная фармакологическая коррекция, нацеленная на активацию проапоптотических и/или ингибирование антиапоптотических сигнальных белков, является весьма перспективным направлением онкохимиопрофилактики и терапии. Особенно эффективными и наиболее перспективными с точки зрения их химиопрофилактической активности выглядят таргетные препараты, одновременно блокирующие патологическую пролиферацию и стимулирующие апоптоз трансформированных клеток. При этом, осуществляя разработку новых или исследуя активность уже известных противоопухолевых соединений, следует помнить о том, что идеальное фармакологическое средство такого рода должно обладать избирательной проапоптотической активностью в отношении опухолевых клеток, не влияя при этом на жизнеспособность нормальных не-трансформированных клеток.

Взаимодействие иммунной системы и опухоли

Иммунология опухолей является одной из наиболее бурно развивающейся в последние годы областью онкологии. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования утвердили концепцию иммунологического надзора за опухолевым ростом и показали, что иммунная система спо-

собна распознавать и разрушать клетки возникающих злокачественных опухолей. Иммунная система при этом играет тройную роль. Во-первых, она может защищать хозяина от вирус-индуцированных опухолей, ограничивая или прекращая вирусную инфекцию. Во-вторых, своевременная элиминация патогенов и быстрое прекращение воспаления предупреждает образование воспалительного очага, благоприятного для развития опухоли. Наконец, иммунная система может идентифицировать и устранять опухолевые клетки, на основе распознавания опухолеспецифических антигенов на клетках конкретных тканей. Этот процесс идентификации трансформированных клеток и элиминации их прежде, чем сформируется опухоль, и называется иммунологическим надзором. В то же время, иммунная система может способствовать опухолевой прогрессии. Двойственный характер взаимодействия иммунной системы и опухоли в настоящее время рассматривается как динамический процесс иммуноредактирования, состоящий из трех фаз: элиминации, равновесия и ускользания. В период элиминации клетки врожденного и адаптивного иммунитета разрушают возникающие клетки опухоли задолго до клинического проявления болезни. В фазе равновесия некоторые опухолевые клетки не разрушаются, и этап элиминации может перейти в фазу равновесия, в период которой иммунологические механизмы сдерживают дальнейшее развитие опухоли. Если опухоль «ускользает» от иммунологического распознавания и разрушения, она прогрессирует из фазы равновесия в фазу «ускользания» и становится клинически очевидной. Опухоль, в свою очередь, обладает различными механизмами, способными разрушать иммунологическую защиту. Таким образом, взаимодействие иммунной системы со злокачественной опухолью представляет собой тонкий баланс между процессами иммунной активации и иммунной супрессии.

Опухолевые клетки экспрессируют широкий спектр поверхностных антигенов, многие из которых являются мишенями клеток иммунной системы. В настоящее время их разделяют на три группы: опухолеспецифические, опухолеассоциированные и онкофетальные антигены. Опухолеспецифиче-

ские антигены не экспрессируются на нормальных клетках и могут представлять собой или белки онкогенных вирусов, или белки, являющиеся результатом соматических мутаций, возникающих при появлении опухоли и в процессе ее роста. Некоторые из этих мутантных белков могут восприниматься иммунной системой, как чужеродные. Этот класс антигенов, скорее всего, менее чувствителен к механизмам иммунологической толерантности и может представлять удобную мишень для иммунологического контроля и иммунотерапии. Опухولةассоциированные антигены являются или дифференцированными, или aberrантно экспрессированными нормальными белками, или белками, возникшими в результате посттрансляционной модификации. Так как опухولةассоциированные антигены являются нормальными белками, их антигенность зависит или от аномальных уровней экспрессии, или от ситуаций, когда они могут обойти механизмы естественной иммунологической толерантности. Онкофетальные антигены в норме экспрессируются в семенниках, яичниках плода и трофобластах. Нетипичная экспрессия этих антигенов на опухолевых клетках делает их привлекательной мишенью для иммунотерапии. Опухولةвые антигены могут локализоваться на поверхности опухолевых клеток в комплексе с молекулами МНС I или II класса, и распознаваться спонтанно возникающими активированными CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетками. Такие спонтанно возникшие активированные Т-клетки, а также антитела к опухолевым антигенам часто обнаруживаются у пациентов с различными вариантами злокачественных опухолей - при меланоме, раке толстой кишки, лейкозах, раке молочной железы и др. Хорошо известно, что ремиссия при некоторых злокачественных опухолях может продолжаться до 10, а в некоторых случаях и до 20 лет, и в удержании опухолевых клеток в «дремлющем» состоянии без клинического проявления болезни в течение многих лет значительную роль играет эндогенный иммунный ответ на антигены опухолевых клеток .

Существует зависимость между количеством определенных популяций иммунокомпетентных клеток в опухолевом микроокружении и перифериче-

ской крови и общей продолжительностью жизни и продолжительностью безрецидивного периода у пациентов со злокачественными новообразованиями. Важную роль в противоопухолевом иммунном ответе играют различные популяции иммунных клеток врожденного и адаптивного иммунитета: НК-, Т-, НКТ-клетки, дендритные клетки и макрофаги. Все эти популяции являются гетерогенными и содержат в своем составе, как клетки с противоопухолевой активностью, так и регуляторные клетки. Для развития эффективного противоопухолевого иммунного ответа необходимо в первую очередь распознавание опухоли иммунной системой. Для этого требуется привлечение антигенпредставляющих клеток в опухолевое микроокружение, распознавание ими опухолевых антигенов и миграция в дренирующие лимфоузлы, и активация антигенспецифических Т-клеток. Активированные Т-клетки должны затем мигрировать в опухолевый узел под действием соответствующих хемокинов. В настоящее время накапливаются данные, которые показывают, что локальная функция Т-клеток регулируется различными миелоидными субпопуляциями, среди которых различают четыре основных типа клеток: опухолеассоциированные макрофаги 1 и 2 типа, дендритные клетки 1 типа и CD103+ дендритные клетки 2 типа. Значительную роль в защите организма от чужеродных агентов и поддержании тканевого гомеостаза играют макрофаги. Костномозговые моноцитарные предшественники, проникая в соответствующие ткани, дифференцируются в зрелые макрофаги и поляризуются в подтипы с различным фенотипом в зависимости от особенностей микроокружения. Макрофаги способны продуцировать провоспалительные цитокины (IL-6, IL-12, IL-23 и TNF- α) и представлять опухолевые антигены. Они определяются в опухолевом узле, как правило, на ранних стадиях развития опухоли и их основными функциями являются стимуляция воспаления, фагоцитоз и противоопухолевая активность.

Главными эффекторными лимфоцитами врожденного иммунитета являются НК-клетки. Они обеспечивают защиту от вирусных инфекций и некоторых других патогенов на ранних стадиях иммунного ответа и участвуют в

контроле опухолевого роста и метастазирования. Инфильтрация опухоли этими лимфоцитами во многих случаях коррелирует с благоприятным прогнозом заболевания. Предполагается также, что НК-клетки способны распознавать и уничтожать стволовые опухолевые клетки. Эффекторная функция НК-клеток связана, главным образом, с их цитолитической активностью, однако, благодаря секретируемым ими цитокинам и хемокинам, они могут также усиливать воспалительный процесс и регулировать последующий Т-клеточный ответ, влияя не только на его силу, но и на качество.

Основными клеткам-эффекторами адаптивного противоопухолевого иммунитета являются цитотоксические CD3⁺ CD8⁺ Т-клетки. Во многих клинических исследованиях инфильтрация опухоли CD3⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами позитивно коррелировала с продолжительностью жизни пациентов. Свидетельства о наличии у онкологических пациентов спонтанных, активированных в отношении опухолевых антигенов, CD8⁺ Т-клеток, являются основанием для развития новых методов иммунотерапии опухолей, в частности таргетной терапии, направленной на блокаду контрольных точек иммунитета (*immune checkpoint inhibition*).

Уникальной популяцией Т-лимфоцитов являются НКТ-клетки. Благодаря своей способности быстро продуцировать достаточные количества различных цитокинов (Th1, Th2, Th3 и/или Th17), они обеспечивают связь между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета. Помимо Т-клеточного рецептора НКТ-клетки экспрессируют некоторые маркеры НК-клеток и Т-клеток памяти. НКТ-клетки участвуют в регуляции иммунных реакций при самых различных заболеваниях: аутоиммунных, аллергических, инфекционных и при злокачественных новообразованиях. НКТ-клетки распознают, как ауто- так и чужеродные, липидные/гликолипидные антигены, представляемые неклассической МНС-I – подобной молекулой CD1d. В настоящее время установлено существование двух основных типов НКТ-клеток: инвариантные (экспрессируют инвариантную α цепь Т-клеточного рецептора V α 24) – НКТ-клетки I типа (iNKТ) и НКТ-клетки, не экспрессирующие V α 24 – НКТ

клетки II типа. NKT-клетки I типа в подавляющем большинстве случаев проявляют противоопухолевую активность, которая во многом зависит от их способности продуцировать $IFN\gamma$. При этом они, как правило, играют роль стимуляторов активности других клеток-эффекторов, таких как NK- и CD8+ T-лимфоциты, хотя могут оказывать и прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки. $IFN\gamma$, продуцируемый iNKT- и NK-клетками, играет также важную роль в подавлении опухолевого ангиогенеза.

Несмотря на способность иммунной системы распознавать и разрушать опухолевые клетки, опухоль преодолевает защитные силы организма, растет и метастазирует. Это обусловлено существованием многочисленных негативных молекулярных и клеточных механизмов, которые препятствуют развитию эффективного противоопухолевого иммунного ответа и обеспечивают «ускользание» опухоли от иммунологического надзора. Эти механизмы разделяются на три категории:

- редукция иммунного распознавания и стимуляции иммунных клеток в результате снижения или потери экспрессии высоко иммуногенных антигенов, или нарушения механизмов представления антигенов, или отсутствия костимулирующих молекул;

- усиление активности механизмов резистентности к цитотоксическим эффекторам иммунитета (например, STAT3), или повышение экспрессии генов, ответственных за выживаемость клеток и генов факторов роста (например, Bcl-2, Her2/neu);

- формирование иммуносупрессивного микроокружения опухоли в результате продукции цитокинов (например, VEGF, TGF- β) и метаболических факторов (например, аденозин, PGE2), индукции/привлечения клеток-супрессоров (например, регуляторных T-клеток и миелоидных супрессорных клеток, M2Mф), или индукции адаптивной иммунной резистентности, путем взаимодействия соответствующих лигандов с ингибиторными рецепторами (например, CTLA-4, PD-1, Tim-3) клеток-эффекторов противоопухолевого иммунитета.

К настоящему времени накоплен огромный материал, свидетельствующий о том, что в регуляции аутоиммунных процессов, а также иммунного ответа на аллотрансплантаты, аллергены, инфекционные агенты и опухолевые клетки существенную роль играют определенные субпопуляции регуляторных CD4⁺ -, CD8⁺ T-, а также NKT-клеток. Они используют разные механизмы регуляции и функционируют на разных стадиях иммунного ответа. В дальнейшем было установлено, что важную роль в развитии и функционировании этих клеток играет транскрипционный фактор FOXP3. Регуляторные CD3⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T-клетки играют значительную роль в обеспечении иммунологической аутоотолерантности и негативном контроле как патологических, так и физиологических иммунных реакций. Они могут подавлять пролиферативную и функциональную активность различных иммунокомпетентных клеток, включая CD4⁺ и CD8⁺ T-клетки. Для подавления функции T-клеток-эффекторов регуляторные T-клетки используют определенные механизмы, которые включают конкурентное связывание IL-2, CTLA-4-зависимый трогоцитоз CD80/86 на дендритные клетки, прямой цитолиз T-эффекторов, продукцию ингибиторных цитокинов и малых молекул (IL-10, TGF- β и IL-35, аденозина) и некоторые другие. При многих вариантах злокачественных опухолей повышение количества регуляторных CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T-клеток в опухолевом узле и периферической крови коррелирует с прогрессированием заболевания.

Основными клетками-эффекторами противоопухолевого иммунитета являются CD8⁺ T-лимфоциты. В то же время, описано несколько популяций регуляторных CD8⁺ T-клеток, способных подавлять пролиферативную и цитотоксическую активность T-клеток-эффекторов. В настоящее время доказано, что NKT-клетки могут, не только стимулировать, но и подавлять противоопухолевый иммунный ответ. Предполагается, что супрессорную активность проявляют, главным образом, NKT-клетки II типа.

В последнее время значительное число исследований посвящено миелоидным супрессорным клеткам, которые вносят значительный вклад в

«ускользание» опухоли от иммунологического надзора. Миелоидные супрессорные клетки являются гетерогенной популяцией незрелых миелоидных клеток, происходящих из КМ. Различные факторы, продуцируемые клетками злокачественной опухоли, останавливают созревание этих клеток в дендритные клетки, гранулоциты и макрофаги, облегчают их поступление в опухоль и накопление в опухолевом микроокружении. Установлено, что при патологических состояниях повышается аккумуляция факторов роста (GM-CSF и VEGF), хемокинов (CXCL12 и CCL2) и цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, и TGF- β), которые активизируют экспансию миелоидных супрессорных клеток в КМ и увеличение количества этих клеток на периферии в очаге воспаления, в том числе в опухоли. Миелоидные супрессорные клетки индуцируют состояние локальной и системной иммунной супрессии, которая характеризуется продукцией активных форм кислорода, оксида азота, аргиназы-1 и цитокинов IL-1, IL-6, IL-10 и TNF- α . Выделяют три основных типа миелоидных супрессорных клеток: промиелоцитарные, моноцитарные и гранулоцитарные.

Важнейшим компонентом опухолевого микроокружения являются опухолеассоциированные макрофаги. Более 80% иммуногистохимических исследований различных образцов опухолевых тканей человека показало, что повышенное количество опухолеассоциированных макрофагов коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания. Инфильтрация опухоли моноцитами/макрофагами индуцируется различными хемокинами, включая (CCL)2, CCL5, CCL7, и (CX3CL)1, а также цитокинами, такими как M-CSF, GM-CSF и VEGF, продуцируемыми опухолевыми клетками. Наиболее важными молекулами, обеспечивающими опухолевую инфильтрацию макрофагов, являются CCL2 и M-CSF. Макрофаги участвуют в стимуляции опухолевого роста, ангиогенезе, метастазировании, в иммунной супрессии и развитии резистентности к химиопрепаратам, продуцируя ангиогенные (VEGF, IL-8, bFGF, IL-1 β , PDGF- β), иммуносупрессивные (IL-10, TGF- β , PGE-2, IDO) и ростовые (PDGF, EGF, HGF, IL-6) факторы. Для определения опухолеассоциирован-

ных макрофагов используют или CD68 маркер или маркеры CD163 и CD204. Опухولةассоциированные макрофаги являются новой привлекательной мишенью противоопухолевой терапии. Основные направления антиопухолеассоциированной макрофагальной терапии включают подавление привлечения макрофагов в опухоль, трансформирование макрофагов 2 типа в макрофаги 1 типа и подавление жизнеспособности макрофагов 2 типа.

Результаты опубликованных к настоящему времени многочисленных клинических исследований, посвященных исследованию роли различных популяций иммунокомпетентных клеток в противоопухолевом иммунитете, указывают на то, что клеточный состав микроокружения опухоли характеризуется высокой гетерогенностью. Он может включать в себя почти все иммунные клетки, включая CD8+, CD4+ Т-клетки, NK- и NKT-клетки, различные популяции регуляторных Т-клеток, В-клетки, дендритные клетки, макрофаги и другие клеточные популяции. В то же время, он, очевидно, различен при опухолях разного типа и даже у пациентов с одной и той же нозологической формой опухоли, и может во многих случаях коррелировать с прогнозом заболевания и результатами лечения, в то время как в других случаях не имеет прогностического значения. В настоящее время огромное внимание уделяется изучению прогностической значимости лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. По результатам различных клинических исследований, оценивающих прогностическое и предиктивное значение некоторых субпопуляций иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих опухолевый узел, установлено, что повышенная инфильтрация опухоли цитотоксическими CD8+ Т-клетками, Th1 и Th17 Т-клетками, NK-и дендритными клетками и макрофагами при некоторых вариантах рака является независимым благоприятным прогностическим фактором. В то же время, высокие уровни CD4+ CD25+ FOXP3+ регуляторных Т-клеток, Th2 CD4+ Т-клеток, как правило, указывают на неблагоприятный прогноз заболевания. Таким образом, в настоящее время назрела необходимость определения иммунологических биомаркеров, коррелирующих с течением заболевания и клиническим эф-

фектом терапии у каждого конкретного пациента, что поможет в разработке индивидуальных подходов к лечению онкологических пациентов и разработке новых более эффективных методов противоопухолевой терапии. Очевидно, наиболее оптимальным является сочетание способов, непосредственно воздействующих на эффекторное звено иммунитета (например, вакциноterapia), с подавлением/блокадой супрессорного звена (например, воздействие на контрольные точки иммунитета), а также сочетание иммунотерапии и таргетной терапии с классическими методами лечения (химио-, радиотерапия и другие).

2.2. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕМОБЛАСТОЗОВ

Молекулярно-биологические методы в онкогематологии применяются для установления диагноза, составления прогноза, оценки эффективности и определения тактики лечения гемобластозов. Результаты исследований, проведенных при помощи молекулярных методов, существенно дополняют канонические цитоморфологические и цитохимические критерии диагностики. Аномальный иммунофенотип определяют при помощи проточной цитофлуориметрии. Использование широкой панели антител дает возможность определить природу опухолевых клеток, установить правильный диагноз, без чего невозможно проведение адекватного лечения. Кроме того, проточная цитофлуориметрия применяется и для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ). Классические методы цитогенетического анализа позволяют получить неоценимую информацию при установлении диагноза в дебюте заболевания. Диагностика гемобластозов стала более надежной с появлением специфических молекулярных зондов, при помощи которых можно проводить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и выявлять хромосомные aberrации даже в неделящихся клетках. Кроме того, метод FISH позволяет с высокой чувствительностью обнаруживать остаточные опухолевые клетки, что крайне необходимо при мониторинге МОБ. Применение молекулярных методов - в особенности метода ПЦР - для диагностики гемобластозов стало

возможным в результате накопления данных о молекулярных механизмах возникновения этих заболеваний. В настоящее время охарактеризованы многие генетические дефекты, которые приводят к неопластической трансформации кроветворных клеток. Были исследованы на молекулярном уровне области слияния материала разных хромосом, которые обмениваются своими частями в результате многочисленных повторяющихся транслокаций – маркеров гемобластозов, которые ранее были исследованы и классифицированы с помощью цитогенетических методов. Оказалось, что существуют два принципиально разных варианта структурных перестроек как в случае транслокаций, так и инверсий. Так, некоторые гены оказываются вблизи точек разрыва и приобретают порой такое новое соседство, которое коренным образом изменяет характер их работы, но структура таких генов обычно остается прежней. Если разрыв происходит внутри самих генов, то образуются гены-химеры, получающиеся в результате слияния без сдвига рамки считывания последовательностей разных генов. Таким образом, в первом случае не возникает слитых между собой генов, они только пространственно сближаются, а малигнизация клеток зависит от количественных параметров работы таких генов и их взаимного влияния. Во втором случае образуется слитный новый ген, сохраняющий лишь некоторые важные черты своих предшественников.

Молекулярная диагностика онкомаркеров, которые активируются при гемобластозах одним из двух описанных выше способов, проводится по-разному. В первом случае диагностику при помощи метода ПЦР проводят на основе данных о структуре геномных точек разрыва, если они возникают у разных больных в пределах разрешающей способности метода ПЦР, определяемой максимальным размером фрагмента ДНК, который может синтезировать полимеразы. В этом случае анализируемым материалом является препарат геномной ДНК, выделенной из клеток КМ или периферической крови пациентов. Кроме того, диагностику можно осуществлять, определяя уровень экспрессии того онкогена, который структурно не изменился, но в процессе хромосомных перестроек оказался гиперэкспрессированным в результате

сближения его промоторной области с энхансером гена, который в норме был расположен в другой хромосоме. Для количественной оценки уровня экспрессии таких онкомаркеров применяют метод ПЦР в реальном времени. При этом в качестве исследуемого материала используют тотальную РНК, выделенную из клеток КМ или периферической крови пациентов. При помощи фермента обратной транскриптазы РНК превращается в к-ДНК, которая затем служит матрицей в реакции ПЦР в реальном времени. Способ количественной оценки зависит при этом от того, каким контрольным материалом располагает исследователь. Примером заболевания, при котором происходит активация онкогена, но не меняется организация его структурной части, может служить лимфома Беркитта. При этом малигнизация В-лимфоцитов чаще всего происходит в результате транслокации $t(8;14)(q24;q32)$, возникающей в 90% случаев таких лимфом. Данная транслокация приводит к сближению гена *c-MYC* из 8 хромосомы с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов (H) из 14 хромосомы. Две другие транслокации $t(2;8)$ и $t(8;22)$, выявляемые при лимфоме Беркитта, приводят к тому, что «ниже» последовательностей гена *cMYC* оказываются последовательности генов легких цепей иммуноглобулинов каппа и лямбда из 2 и 22 хромосом, соответственно. Близость энхансеров генов цепей иммуноглобулинов ведет к повышенной экспрессии гена *c-MYC*. Молекулярную диагностику этого заболевания проводят по оценке уровня экспрессии гена *c-MYC* и при помощи анализа геномных точек разрыва. При фолликулярной лимфоме в результате транслокации $t(14;18)(q32;21)$ ген *BCL2* из 18q21 активируется в результате сближения с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов из 14 хромосомы. У пациентов с некоторыми лимфомами обнаруживают также реципрокную транслокацию $t(11;14)$, при которой происходит активация гена циклина D1 (*PRAD1*) из 11q13 под воздействием энхансера генов тяжелых цепей иммуноглобулинов из 14q32.

Острые Т-клеточные лейкозы бывают связаны с несколькими разными транслокациями, при которых происходит активация генов факторов тран-

скрипции путем сближения с генами иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. Например, ген *HOX11*, локализованный в 10 хромосоме, активируется при некоторых Т-ОЛЛ в результате транслокаций $t(10;14)(q24;q11)$ и $t(7;10)(q35;q24)$ (активация генами рецепторов Т-клеток из 14 и 7 хромосом - альфа и бета, соответственно). В ряде случаев Т-ОЛЛ ген *TAL1(SCL)* активируется энхансерами генов иммуноглобулинов в результате транслокации $t(1;14)$. Кроме того, при Т-ОЛЛ может наблюдаться гиперэкспрессия гена *RBTN(TTG)* из 11 хромосомы при активации генами рецепторов Т-лимфоцитов при транслокациях $t(11;14)(p13;q11)$ и $t(11;14)(p15;q11)$.

Активация протоонкогенов, приводящих к развитию гемобластозов, может осуществляться не только путем сближения с кодирующими последовательностями генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов, но и с другими генами. Например, активация гена *EVI1* несет ответственность за развитие 2% случаев ОМЛ и МДС. Ген *EVI1* лежит в длинном плече 3 хромосомы и активируется при $inv(3)(q21q26)$, а также при $t(3;3)(q21;q26)$. Показано, что эта активация вызывается сближением *EVI1* с геном белка рибофорины 1, лежащего в другом локусе той же 3 хромосомы.

Во всех перечисленных случаях молекулярная диагностика возможна при помощи количественной оценки уровня экспрессии активированных генов при помощи метода ПЦР в реальном времени. При втором варианте активации протоонкогенов, вызывающих развитие гемобластозов, происходит существенная структурная перестройка, в результате которой возникают химерные онкогены. Структурные особенности химерных онкогенов – маркеров гемобластозов определяют тактику проведения молекулярной диагностики. Как правило, в этих случаях рутинная диагностика при помощи ПЦР-амплификации областей геномной ДНК, содержащих точки разрыва, оказывается невозможна, так как геномные точки разрыва индивидуальны для разных больных и возникают случайных местах обширных интронных последовательностей. Клонирование и изучение геномных точек разрыва у таких пациентов используется исключительно при проведении фундаментальных ис-

следований и не применяется для целей диагностики. Редким исключением является микроделеция гена TAL1(SCL), которая встречается в 25% детских Т-клеточных ОЛЛ. Некоторые геномные точки разрыва при этой микроделеции можно выявлять с целью диагностики при помощи ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК. При созревании м-РНК химерных онкогенов большое разнообразие, существующее на уровне геномных точек разрыва у разных больных, несущих одну и ту же хромосомную перестройку, нивелируется за счет природного механизма – сплайсинга. В итоге все сводится к образованию нескольких основных вариантов зрелой м-РНК химерного онкогена, которые могут выявляться у разных больных. В настоящее время диагностику химерных онкогенов при гемобластозах проводят не по геномной ДНК, а по детекции точек слияния экзонов генов-партнеров, которые участвуют в образовании химерного онкогена. Для этого используют метод обратной транскрипции-ПЦР, чувствительность которой позволяет выявлять даже 1 опухолевую клетку среди 10000 - 1000000 нормальных (чувствительность $10^4 - 10^6$). При этом всего две или три системы праймеров позволяют исследователю при помощи обратной транскрипции-ПЦР проводить определение основных вариантов того или иного химерного онкогена. Например, при помощи двух систем праймеров можно выявлять при помощи обратной транскрипции-ПЦР два основных типа м-РНК химерного онкогена PML/RARa (варианты bcr3 и bcr1), а также редкий вариант bcr2 PML/RARa (при помощи той же диагностической системы, которую применяют для обнаружения варианта bcr1). Таким же образом при помощи метода обратной транскрипции-ПЦР проводят диагностику химерных онкогенов BCR/ABL типов p190 и p210 (разные виды транслокации t(9;22) - маркеры для ОЛЛ и ХМЛ); MLL/AF9, MLL/AF4, MLL/ENL (t(9;11), t(4;11), t(11;19) - маркеры ОЛЛ); E2A/PBX1, SIL/TAL1, TEL/AML1 (t(1;19), del(1)(p32;p32), t(12;21) - маркеры ОЛЛ); AML1/EVI1, AML1/ETO, CBFB/MYH11 (t(3;21), t(8;21), inv(16;16) - маркеры ОМЛ). Обнаружение у пациента методом обратной транскрипции-ПЦР характерного химерного онкомаркера служит основанием для поста-

новки соответствующего диагноза. Последующие определения экспрессии этого онкомаркера у данного пациента в КМ или периферической крови позволяют оценить эффективность лечения. При некоторых нозологиях, например, при ХМЛ и остром промиелоцитарном лейкозе, проводимое лечение может привести к полному исчезновению молекулярного сигнала при том же высоком уровне чувствительности диагностики с помощью метода обратной транскрипции-ПЦР. В этом случае говорят о достижении молекулярной ремиссии. Последующий мониторинг тем же методом позволяет вовремя зафиксировать момент молекулярного рецидива, когда вновь будет выявляться экспрессия химерного онкогена, причем до наступления цитогенетического и гематологического рецидива. Эта информация дает возможность провести упреждающее терапевтическое воздействие и предотвратить развитие гематологического рецидива. Сочетание современных методов терапии лейкозов, позволяющих достичь молекулярной ремиссии, и высокочувствительной молекулярной диагностики стимулирует поиск эффективных способов лечения молекулярных рецидивов. Обычный метод обратной транскрипции-ПЦР, который дает только качественную информацию о наличии или отсутствии экспрессии химерных онкогенов, все больше уступает место сочетанию обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. При помощи ПЦР в реальном времени можно определить, с какой скоростью и какой глубины достигает снижение молекулярного сигнала, соответствующего экспрессии онкомаркера и связанного с изменением в процессе лечения объема опухолевой массы. Чувствительность этого метода сравнима с чувствительностью обратной транскрипции-ПЦР, но при этом ПЦР в реальном времени позволяет оценить количественно динамику убывания/роста опухолевого клона даже при полном цитогенетическом ответе. Скорость и амплитуда снижения/нарастания молекулярного сигнала, полученного при помощи ПЦР в реальном времени, становятся одними из главных показателей эффективности лечения лейкозов. Большое разнообразие видов лейкозов затрудняет проведение эффективного мониторинга МОБ, так как не всегда удается выявить

для конкретного пациента уникальный опухолевый маркер. В связи с этим весьма перспективным представляется внедрение в диагностическую практику методов оценки МОБ по анализу универсальных опухолевых маркеров. Одним из наиболее предпочтительных универсальных маркеров гемобластозов на сегодняшний день является онкомаркер WT1. Перспективным маркером является также онкомаркер PRAME, с которым связаны некоторые особенности клинических проявлений лейкозов. Ценную прогностическую информацию для лечения гемобластозов можно получить, если параллельно с определением основного маркера анализировать при помощи молекулярно-биологических методов изменение работы некоторых других генов. Показано, что при диагностике острых плазмочитарных лейкозов целесообразно исследовать не только основной маркер PML/RARa, но и оценивать повышение уровня экспрессии и определять частичную дупликацию гена FLT3, – факторы неблагоприятного прогноза. При ОЛЛ и ОМЛ неблагоприятным прогностическим маркером является частичная дупликация гена MLL, выявляемая при помощи обратной транскрипции -ПЦР. Молекулярная диагностика эритремии оказывается более надежной, если не только оценивать при помощи метода ПЦР в реальном времени гиперэкспрессию гена PRV-1, но и определять ассоциированную с этим заболеванием точечную мутацию гена Як-киназы. Очень эффективен мониторинг МОБ опухолей лимфатической природы с помощью анализа уникальных перестроек генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. Успех ТГСК при лечении гемобластозов во многом зависит от молекулярного анализа приживления клеток донора и поведения остаточных клеток реципиента. При этом можно оценивать поведение опухолевого клона по анализу характерного маркера, если он был выявлен до проведения трансплантации. Но даже при отсутствии такого маркера, клетки донора и реципиента можно различить при помощи молекулярного анализа мультиаллельных STR- и VNTR- полиморфизмов, которые используются также в качестве косвенных маркеров при семейном анализе наследственных патологий и для идентификации личности.

2.3. ОСТРЫЕ ЛЕЙКОЗЫ

Острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу первичных клональных заболеваний КМ в результате злокачественной трансформации стволовой гемопоэтической клетки. Эта патология характеризуется повторяющимися хромосомными aberrациями и мутациями генов, что является ключевыми причинными факторами в патогенезе заболевания. Основная причина гемобластозов - канцерогенные агенты, которые, действуя на геном кроветворной клетки, вызывают трансформацию ее нормальной генетической программы на программу формирования злокачественного новообразования. Канцерогенные агенты по своему происхождению делят на три группы: химические, физические и биологические.

Доказано, что многие химические вещества, в т. ч. некоторые лекарственные средства, способны (при определенных условиях) вызывать гемобластоз. Из лекарственных препаратов, используемых для проведения высокодозной химиотерапии, сильными мутагенами являются хлорамбуцил, прокарбазин, циклофосфамид, ломустин, тенипозид, этопозид. Регистрируемая частота развития лейкозов через 2–10 лет после их применения достигает до 15%. К возникновению опухолей могут приводить химические агенты, входящие в состав пищи, и соединения, используемые в различных сферах производства. Известно более 1500 органических и неорганических химических соединений, потенциально обладающих канцерогенным эффектом. Важно, что большинство потенциально канцерогенных веществ сами по себе не вызывают развитие гемобластоза. Проканцерогены, или преканцерогены, являются патогенными агентами непрямого действия и в организме подвергаются физико-химическим превращениям, в результате чего становятся конечными (истинными) канцерогенами. Конечными канцерогенами, вызывающими изменения в геноме нормальной клетки, которые ведут к ее трансформации в опухолевую, являются алкилирующие соединения, эпоксиды, диолэпоксиды, свободнорадикальные формы ряда веществ.

К физическим канцерогенам относят радиоактивное излучение веществ, содержащих ^{32}P , ^{131}I , ^{90}Sr и др., рентгеновские лучи; поток нейтронов; α -, β - и γ -частицы; ультрафиолетовый спектр. Основная мишень канцерогенных агентов – ДНК - подвергается либо их прямому действию, либо через своеобразные медиаторы канцерогенеза - свободные радикалы кислорода, липидов и других органических и неорганических веществ. Лица, хронически, периодически или даже однократно подвергавшиеся воздействию физических мутагенов, в т. ч. с лечебной целью, представляют группу риска по развитию различных видов гемобластозов. Доказанным является факт развития гемобластозов после высокодозной лучевой терапии опухолей (у 5–10% пациентов). У врачей-рентгенологов лейкозы выявляются чаще, чем у врачей других специальностей. Воздействие радиации при нарушении технической безопасности, при авариях на атомных реакторах, при ядерных испытаниях повышает уровень заболеваемости среди пострадавших по сравнению с общей популяцией. Как правило, после эпизода или курса облучения, лейкоз развивается в течение 5–10 лет.

К биологическим канцерогенным агентам относят, в первую очередь, онкогенные вирусы. Доказан факт инициации гемобластозов под влиянием онкогенных вирусов. Так, вирус Эпштейна–Барр встречается в 100% лимфомы Беркитта, вирус Т-клеточного лейкоза человека типа I - при Т-лимфолейкозе. Ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы могут встраиваться в геном кроветворных клеток человека и вызывать их опухолевую трансформацию. По типу вирусной нуклеиновой кислоты онкогенные вирусы подразделяют на ДНК- и РНК-содержащие. Гены ДНК онковирусов непосредственно внедряются в геном клетки-мишени. Участок ДНК онковируса (собственно онкоген), интегрированный с клеточным геномом, вызывает опухолевую трансформацию клетки, при этом не исключается, что один из генов онковируса может играть роль промотора клеточного протоонкогена. К ДНК-содержащим онковирусам относят некоторые виды аденовирусов, паповавирусы и герпесвирусы. РНК-содержащие вирусы - онкорнави-

русы, или ретровирусы, интегрируют свою нуклеиновую кислоту в клеточный геном не непосредственно, а после образования ДНК-копий на матрице РНК. Такая ДНК-копия беспрепятственно встраивается в геном гемопоэтической клетки-мишени, гены ее экспрессируются, что обуславливает трансформацию в клетку гемобластоза.

Наряду с воздействием канцерогенных агентов выявлен ряд факторов, с одной стороны, не способных вызывать гемобластоз, однако, с другой, создающих условия, существенно повышающие эффект действия канцерогенных агентов. Подобные факторы называют факторами риска развития гемобластоза:

- генетическая предрасположенность к онкогенезу. Описано доминантное и рецессивное наследование хронического лимфолейкоза, а также низкая заболеваемость этим лейкозом в одних этнических группах и высокая в других. Чаще в этих случаях наследуется не сам лейкоз, а «нестабильность» генома - сниженная резистентность хромосом гемопоэтических клеток к действию мутагенов, что предрасполагает эти клетки к опухолевой трансформации. В ряде случаев генетическая природа предрасположенности к возникновению опухолей определена. К числу наиболее значимых относят аномалии генов репарации ДНК (определяют повышенную «чувствительность» к канцерогенным факторам); дефекты генов-супрессоров опухолевого роста (например, при многих гемобластозах выявляется дефект белка p53); другие генные и хромосомные дефекты, выявляемые при лейкозах (так, при хроническом миелолейкозе нередко выявляется филадельфийская хромосома - результат реципрокной транслокации локусов хромосом 9 и 22 с формированием гена BCR-ABL1, его экспрессией и синтезом белка с тирозинкиназной активностью). При В-клеточных лимфомах и лейкозах часто обнаруживают разрывы в хромосоме 14 в локусе 32q, где локализируются гены, кодирующие синтез тяжелых цепей иммуноглобулинов. Более высокая заболеваемость лейкозами наблюдается при врожденном агранулоцитозе, целиакии, анемии

Фанкони, синдроме Дауна, синдроме Вискотта–Олдрича, нейрофиброматозе Реклингхаузена и ряде других;

- сниженная активность механизмов противоопухолевой защиты организма. Под воздействием того или иного канцерогена и при наличии факторов риска гемопоэтическая клетка претерпевает ряд последовательных изменений, которые приводят к гемобластозу.

Патогенез гемобластозов определяет процесс трансформации нормальной гемопоэтической клетки в опухолевую как результат изменений в ее генетической программе. В большинстве случаев это изменение определяет прогноз болезни и стратегию лечения. Нестабильность генома клетки, ставшей опухолевой, приводит к появлению в первоначальном опухолевом клоне новых субклонов, среди которых в процессе жизнедеятельности организма, а также под воздействием лечения «отбираются» наиболее автономные клетки новообразования (феномен «опухолевой прогрессии»). Этим феноменом объясняют прогрессивность течения гемобластозов, их резистентность к цитостатикам, генерализацию процесса и нарастание степени злокачественности. Единый конечный результат действия канцерогенов различной природы (химической, биологической, физической) на гемопоэтические клетки обеспечивается нарушением взаимодействия в клеточном геноме онкогенов и антионкогенов. Стимуляция канцерогенами экспрессии онкогенов и/или депрессия антионкогенов и обеспечивает опухолевую трансформацию клеток. В этом процессе выделяют несколько общих этапов. На первом этапе происходит взаимодействие канцерогенов с прото- и антионкогенами (онкосупрессорами) генома нормальной гемопоэтической клетки. На втором этапе канцерогенеза вследствие этого взаимодействия подавляется активность онкосупрессоров, а также происходит трансформация протоонкогенов в онкогены. Экспрессия онкогена — необходимое и достаточное условие для трансформации нормальной клетки в опухолевую. В результате подавления активности онкосупрессоров и экспрессии онкогенов на третьем этапе синтезируются и реализуют свои эффекты (непосредственно или с участием кле-

точных факторов роста и рецепторов к ним) онкобелки. С этого момента генотипически измененная гемопоэтическая клетка приобретает опухолевый фенотип. На четвертом этапе клетка гемобластоза начинает делиться с образованием клона подобных ей атипичных клеток. Неопластический клон при гемобластозах имитирует иерархическую структуру нормального кроветворения. Клеточные пулы находятся в динамическом равновесии, изменение которого влияет на клиническое течение, прогноз заболевания и ответ на терапию. Пул самообновляющихся опухолевых клеток (0,2–1%), способных давать начало новым гемопоэтическим клеткам, подобен (но не идентичен!) стволовым кроветворным клеткам. Эти клетки получили название лейкозных стволовых клеток. Эта клеточная популяция гетерогенна, чему способствуют их аберрантная дифференцировка, а также постоянные мутации и эпигенетические изменения. Результаты специальных исследований позволили сделать вывод, что лейкозные стволовые клетки образуются вследствие лейкогенных мутаций на уровне стволовой кроветворной клетки. Исключением являются некоторые виды лейкозов (например, острый промиелоцитарный лейкоз), когда лейкозная стволовая клетка имеет фенотип более зрелых предшественников. Как следствие, лейкозные стволовые клетки и стволовые кроветворные клетки имеют большое сходство (наряду с рядом фенотипических и молекулярно-генетических отличий). Основными маркерами и тех и других клеток являются CD34+, CD38-, CD71-, HLA-DR-, CD90-. На лейкозных стволовых клетках дополнительно экспрессирован антиген CD123 (рецептор к IL3) и отсутствует CD117 (KIT-рецептор). Лейкозные стволовые клетки при ОЛЛ экспрессируют и CD58. Считается, что лейкогенные мутации приводят к усилению эффектов пролиферативных сигналов, к отмене апоптоза опухолевых клеток и/или блоку их дифференцировки, повышению способности к самообновлению. Указанные изменения сопровождаются формированием состояния нестабильности генома. Методы молекулярной генетики выявили в лейкозных стволовых клетках признаки мутации генов опухолевой супрессии (IRF1, DAPK), генов транскрипционного антиапоптотического фактора NF-

kB и тирозинкиназного рецептора FLT3 и др. Формирование нестабильного генома лейкозных стволовых клеток обусловлено повышением их способности к самообновлению и, соответственно, к нарушению реализации механизмов репликативного старения. Это создает условия для отмены теломеразного контроля пролиферации клеток гемобластоза. Теломерные участки хромосом (теломеры) представляют собой концевые повторяющиеся строго определенные нуклеотидные последовательности (TTAGGG)_n. Образующиеся теломерные «шапочки» предохраняют хромосомы от слияний, транслокаций и других аномальных изменений в процессе митоза. В норме при пролиферации клеток имеет место неполная репликация концевых участков, происходит их укорочение. «Концевая недорепликация» частично компенсируется специализированным ферментом теломеразой. В подавляющем большинстве клеток человека теломераза надежно репрессирована. Именно поэтому при каждом делении происходит укорочение теломерных участков. И лишь в митотически активных клетках сохраняется ограниченная, временно индуцируемая теломеразная активность. Сигналом для выхода клетки из митоза служит достижение теломером минимальной длины, обеспечивающей защиту хромосомы от повреждения. Это явление названо репликативным старением. Репликативное старение у человека - это мощный барьер на пути развития опухолей. Однако в 85–90% всех опухолей человека обнаруживают активацию теломеразы, что создает условия безграничной пролиферации опухолевых клеток. Известно, что около 95% лейкозных стволовых клеток находится в покоящемся состоянии, и, несмотря на малое общее количество этих клеток, по-видимому, именно они избегают медикаментозного уничтожения и образуют резидуальную опухолевую популяцию, которая может быть основой рецидива гемобластоза.

Развитие любого новообразования проходит несколько стадий — инициации, промоции, опухолевой прогрессии. Стадия инициации может быть спровоцирована генетическим повреждением, определяющим развитие болезни (Disease-defining lesion), то есть специфической мутацией, обеспечи-

вающей формирование клона клеток гемобластоза. Клетки этого клона, обладая высоким пролиферативным потенциалом, активно делятся (стадия промощии); на этом этапе возможно формирование нестабильного генома и, соответственно, его новых аномалий, способствующих или активации пролиферации, и/или угнетению апоптоза, и/или дисрегуляции клеточного цикла. В частности, при лимфоидных опухолях возможна состыковка кодирующих последовательностей протоонкогена и сильных промоторов генов TcR (T-cell receptor) или иммуноглобулинов, что приводит к количественным изменениям в экспрессии протоонкогенов. Мутации могут представлять не только нарушения в геноме, но и носить эпигеномный характер, в частности, в результате нарушения метилирования ДНК или ацетилирования гистонов и, соответственно, изменения экспрессии генов, регулирующих пролиферативную активность клеток гемобластоза или их способность к выживанию. Накопление этих повреждений и формирование все более и более агрессивного клона опухолевых клеток характеризует стадию опухолевой прогрессии.

Биологическая характеристика гемобластоза, как и любого новообразования, заключается в формировании атипизма, нарастающего в ходе опухолевой прогрессии. Атипизм гемобластозов - это совокупность существенных качественно и количественно измененных биологических свойств клеток и ткани новообразования, отличающих их от аутологичных нормальных и других патологически измененных клеток и тканей. Различают тканевой и клеточный атипизм.

Тканевой атипизм представляет собой свойство солидных опухолей, которое характеризуется нарушением структуры опухолевой ткани. Что касается гемобластозов, то структурный атипизм характерен, в частности, для таких онкогематологических заболеваний, как лимфомы, опухоль при которых может иметь различную форму и размеры.

Клеточный атипизм может проявляться в виде структурных (морфологических), обменных (биохимических) и функциональных нарушений.

Структурный, или морфологический, атипизм клеток при онкогематологических заболеваниях проявляется, например, наличием двух типов клеток в гемопоэтической ткани и периферической крови - нормальных и опухолевых. Опухолевые клетки имеют необычное строение и отличаются от нормальных клеток по величине, форме, антигенам мембраны (возможно появление маркеров опухолей, то есть изменение иммунофенотипа неопластических клеток). Изменяются количество и структура мембранных рецепторов лейкозных клеток, ядра отличаются по величине и форме, структуре хроматина. Наблюдаются различные цитогенетические и генетические дефекты.

Биохимический атипизм лейкозных клеток характеризуется отклонением от нормы биохимических характеристик клеток и/или продуктов их метаболизма. В опухолевых клетках усилены все виды обмена (углеводов, белков, липидов), повышен синтез нуклеиновых кислот, что необходимо для обеспечения митотической активности этих клеток. В малигнизированных клетках возможно нарушение водно-электролитного обмена. При онкогематологических заболеваниях помимо общих возможно формирование и специфических признаков опухолевого атипизма: прекращение синтеза лейкозными клетками отдельных ферментов (например, кислой фосфатазы, миелопероксидазы) и, как следствие, катализируемых ими процессов; пара- и диспротеинемии (наблюдается, например, при миеломной болезни, макроглобулинемии Вальденстрема, болезни тяжелых цепей Франклина).

Атипизм функций клеток гемобластозов проявляется нарушением функции как трансформированных (опухолевых), так и нормальных форменных элементов крови. Это приводит к существенным нарушениям фагоцитарной активности лейкоцитов, механизмов реализации клеточного и гуморального иммунитета, транспорта кислорода, CO₂, микроэлементов, субстратов обмена веществ и метаболитов. В совокупности указанные нарушения кроме развития различных типов иммунодефицитов, геморрагий и/или тромбозов, гипоксии и других состояний обуславливают снижение противоинфекционной устойчивости и антибластомной резистентности организма.

Нарастание структурного, биохимического и функционального атипизма проявляется в виде нестабильности генома клеток новообразования; отсутствия их репликативного старения (иммортализация); снижения чувствительности их к ростосупрессирующим сигналам; способности к генерации пролиферативных сигналов и, соответственно, пониженной потребности во внешних сигналах для инициации и поддержания клеточной пролиферации; нарушения процессов апоптоза, некроптоза и аутофагии; нарушения дифференцировки клеток опухоли; изменения структуры цитоскелета клеток новообразования; взаимодействия их со стромальными клетками с взаимопотенцирующим влиянием продуцируемых ими цитокинов; индукции ангиогенеза; нарушения межклеточного взаимодействия, создающего условия к инвазии в нормальные ткани; способности к метастазированию.

Одной из важных особенностей атипизма опухолевых клеток является изменение их цитоскелета. В связи с этим нарушается адгезионное взаимодействие клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом, в результате чего формируется так называемый локомоторный фенотип клеток новообразования. Способность клеток новообразования к инвазии сочетается с увеличением продукции ими протеолитических ферментов, которые разрушают внеклеточный матрикс и обеспечивают трансформацию неактивных форм «мотогенных» цитокинов в активные, способствуя миграции клеток. Установлено, что многие цитокины являются одновременно и митогенами и мотогенами (например, EGF, HGF/SF, PDGF, VEGF и др.). Имеет значение и активация белков семейства Ras, что приводит к повышению активности ферментов, играющих ключевую роль в полимеризации актина, реорганизации цитоскелета и регуляции движения клеток.

Приобретение клетками гемобластоза локомоторного фенотипа происходит параллельно с повреждением эндотелия. Это проявляется изменением адгезивноагрегационных свойств сосудистой стенки, усилением лейкоцитарно-эндотелиального взаимодействия, адгезией лейкоцитов и их миграцией через эндотелий. Таким образом, создаются условия для инфильтрации орга-

нов и тканей клетками гемобластоза, в результате чего развиваются лимфаденопатии, гепато- и спленомегалия, формируются лейкемиды. В последнее время пересмотрены представления о значении неоангиогенеза в патогенезе лейкозов. Считается, что наблюдаемая при лейкозах повышенная васкуляризация красного костного мозга является следствием продукции опухолевыми клетками VEGF-A, обладающего ангиогенным эффектом. Пролиферирующие эндотелиальные клетки также продуцируют указанный фактор. В свою очередь образующийся в большом количестве VEGF-A может взаимодействовать с неопластическими клетками, имеющими рецепторы к нему, — VEGFR-1 и VEGFR-2. Таким образом, имеет место ауто- и паракринная активация пролиферации неопластического клона клеток.

В отличие от солидных опухолей при лейкозах наблюдается и выступает на первый план недостаточность гемопоэтической ткани. Это происходит в результате вытеснения нормальных кроветворных клеток неограниченно размножающимися лейкозными клетками, а также вследствие угнетения пролиферации нормальных элементов под влиянием факторов, синтезируемых малигнизированными клетками. В результате развиваются анемия, тромбоцитопения, уменьшается количество нормальных лейкоцитов. Прогрессирование тромбоцитопении создает условия для развития геморрагического синдрома. Уменьшение количества нормальных лейкоцитов даже при высоком содержании клона лейкозных клеток сопровождается нарушением специфических и неспецифических механизмов иммунобиологической защиты организма и, соответственно, снижением устойчивости организма к возбудителям инфекций и нередко к развитию других опухолей. Последние часто являются непосредственной причиной гибели больных с гемобластозами. При нарушении функций лимфоидных клеток возможно развитие и иммунопатологических состояний, в частности иммунной аутоагрессии. В основу формирования и нарастания атипизма гемобластозов заложен процесс опухолевой прогрессии. По существу, это механизм нарастания степени злокачественности гемобластозов в результате изменений генетической программы

их клеток: клетки, становясь гетерогенными и получая своего рода автономность, приспособляются к условиям среды, становятся невосприимчивыми к цитостатической терапии.

Классификация острых лейкозов

С целью объединения морфологических и цитохимических основ дифференциации острых лейкозов в 1976 г. франко-американо-британской группой гематологов была разработана FAB-классификация острых лейкозов, пересмотренная и дополненная в 1991 г. В соответствии с данной классификацией острые лейкозы разделены на две большие группы: нелимфобластные (миелоидные) и лимфобластные. FAB-классификация до сих пор остается широко используемой в клинической практике для первой линии диагностики острых лейкозов.

FAB-классификация острых лейкозов (1976 г., 1991 г.)

Вид и частота встречаемости острых лейкозов	
Миелоидные (ОМЛ)	
M0	Недифференцируемый ОМЛ (6 %)
M1	ОМЛ без признаков созревания (10%)
M2	ОМЛ с признаками созревания (27%)
M3	Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) (5%) M3м - микрогранулярный промиелоцитарный лейкоз
M4	Острый миеломонобластный лейкоз (21%)
M5	Острый монобластный лейкоз (22%): M5a – без признаков созревания M5b – с признаками созревания
M6	Острый эритромиелоз (острый эритробластный лейкоз, болезнь Ди Гуельмо) (3%)
M7	Острый мегакариобластный лейкоз (6%)
Редкие варианты	Острый эозинофильный, тучноклеточный, базофильный
Лимфобластные (ОЛЛ)	
L1	Острый лимфобластный лейкоз с мелкими однотипными бластными клетками (80%)
L2	Острый лимфобластный лейкоз с крупными гетерогенными бластными клетками (14%)
L3	Острый лимфобластный лейкоз с беркитоподобными бластными клетками (1%)

Однако цитологическая классификация имеет ограниченное значение, так как не описывает корреляции ни с иммунологическими и молекулярно-генетическими характеристиками, ни с ответом на полихимиотерапию и прогнозом. Именно поэтому данная классификация не используется для определения различных групп риска и, соответственно, для определения вида терапии.

В 1995 г. Европейская группа по изучению иммунологии лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemia, EGIL) предложила иммунологическую классификацию острых лейкозов (EGIL, 1995), в основе которой лежит характеристика каждого этапа дифференцировки клеток-предшественниц гемопоэза по наличию на их мембране определенного набора антигенов дифференцировки – СД (cluster of differentiation – кластер дифференцировки). Согласно предложению EGIL, все ОЛЛ делят на две большие группы - В- и Т-линейной направленности, которые в свою очередь подразделяют на подтипы в зависимости от стадии дифференцировки лимфоцитов (таблица 12).

Таблица 12 — Иммунологическая классификация ОЛЛ (EGIL, 1995)

ОЛЛ Т-линии: CD3+ цитоплазматический или мембранный; большинство случаев: ТdТ+, HLA-DR-, CD34-, но эти маркеры не играют роли в диагностике и классификации	
про-Т-ОЛЛ (Т I)	CD7
пре-Т-ОЛЛ (Т II)	CD2 и/или CD5 и/или CD8
кортикальный Т-ОЛЛ (Т III)	CD1a+
зрелый Т-ОЛЛ (Т IV)	CD3+ мембранный CD1a-
ОЛЛ В-линии: CD19+ и (или) CD79a+ и (или) CD22+ цитоплазматический; экспрессия не менее чем двух из трех пан-В-клеточных маркеров; большинство случаев ТdТ+ и HLA-DR+, зрелый В-ОЛЛ часто ТdТ-	
про-В-ОЛЛ (В I)	Нет экспрессии других маркеров
Common-ОЛЛ (В II)	CD10+
пре-В-ОЛЛ (В III)	цитоплазматический IgM+
зрелый В-ОЛЛ (В IV)	цитоплазматический или поверхностный каппа+ или ламбда+-цепи Ig

В отличие от ОЛЛ, иммунологическая характеристика ОМЛ тесно связана с применением морфологических критериев FAB-классификации. Кроме того, при ОМЛ на бластах нередко могут быть выявлены антигены, в норме (на зрелых клетках) ассоциированные с лимфоцитами (CD2, CD7, CD19), или, реже, с натуральными киллерами (CD56). Поэтому для безошибочного

определения линейной принадлежности бластов недостаточно использования одного линейно-ассоциированного маркера, даже такого высокоспецифичного, как миелопероксидаза или лизоцим. Показано, что одновременное отсутствие или аномальная экспрессия CD7 или CD19 при позитивности миелоидных маркеров является доказательством нелимфоидного происхождения лейкоза даже при отсутствии МРО. Появившееся в последние годы описание большого количества случаев ОМЛ с коэкспрессией маркеров другого линейного происхождения не нашло отражения в иммунологической классификации ОМЛ, остающейся до сих пор очень несовершенной (таблица 13).

Таблица 13 - Иммуноморфологическая характеристика ОМЛ

Варианты ОМЛ	Положительные маркеры	Отрицательные маркеры	Нестабильная экспрессия
М0 миелобластный с минимальной миелоидной дифференцировкой бластов	МПО в цитоплазме, Tdt	CD14, CD15, CD41, CD61, гликофорин А	CD4, CD7, CD13, CD33, CD34, HLADR
М1 миелобластный без созревания	МПО, CD33, CD34, HLADR	CD11, CD14, CD41	CD11b, CD13, CD15
М2 миелобластный с созреванием	CD11, CD13, CD15, CD33, HLADR	CD41	CD11b, CD14, CD34
М3 промиелоцитарный М3v гипогранулярный вариант	CD9, CD13, CD15, CD33	CD34, CD41, HLADR	CD2, CD11b, CD14
М4 миеломонобластный М4эоз миеломонобластный с эозинофилией	HLADR, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33 CD2 при М4эо	CD41	CD34
М5а монобластный без созревания М5в монобластный с созреванием	CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, HLADR	CD41	CD34, CD56
М6 острый эритромиелоз	Гликофорин А	CD11, CD13, CD14	CD15, CD33, CD34, HLADR
М7 мегакариобластный	CD33, CD41, CD42, CD61	МПО, CD14, CD15	HLADR, CD13, CD34

Исключениями современной иммунологической классификации ОМЛ являются мегакариобластный лейкоз (ОМЛ, вариант М6) и острый эритромиелоз (ОМЛ, вариант М7), которые верифицируются по экспрессии мегакариоцитарных маркеров CD61, CD41, CD42 или эритроидного антигена гли-

кофорин А (соответственно). Однако, именно они хорошо узнаваемы морфологически.

Обнаружение на бластных клетках одновременной яркой экспрессии антигенов различных гемопоэтических линий требует проведения дифференциальной диагностики бифенотипической от других форм лейкозов. Она проводится, согласно рекомендациям EGIL, если в популяции лейкозных бластов не менее 10% клеток одновременно несут миелоидные и лимфоидные маркеры. Удачным решением является балльная оценка экспрессии маркеров, проверенная длительной практикой, при которой каждый маркер оценивается определенным баллом, а диагноз бифенотипического лейкоза устанавливается при суммарной оценке больше 2 для миелоидной и 1 для лимфоидной линии (таблица 14).

Таблица 14 - Балльная оценка экспрессии маркеров при подозрении на бифенотипический лейкоз

Баллы	Маркеры		
	В - линии	Т – линии	Миелоидной линии
2	CD79a cyIgM cyCD22	CD3 (cy/mem) TCR α/β TCR γ/δ	МПО (cy/mem) (лизоцим, лактоферрин)
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64 CD117

Предполагая бифенотипический лейкоз рекомендуется обращать внимание на внутриклеточную экспрессию не одного, а как минимум двух маркеров миелоидного ряда, чтобы избежать ошибочной гипердиагностики.

В настоящее время наиболее признана в клинической практике классификация острых лейкозов, предложенная экспертами ВОЗ в 2008 г. В соот-

ветствии с ней на основе клонального происхождения и предполагаемого прогноза выделяют следующие подгруппы ОЛЛ:

- В-лимфобластный лейкоз/лимфома, никак более не категоризированный;
- В-лимфобластный лейкоз с характерными (рекуррентными) генетическими нарушениями; • В-лимфобластный лейкоз с t(9;22)(q34;q112); BCR-ABL1;
- В-лимфобластный лейкоз с t(v;11q23); MLL реаранжировкой;
- В-лимфобластный лейкоз с t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1);
- В-лимфобластный лейкоз с гипердиплоидией;
- В-лимфобластный лейкоз с гиподиплоидией;
- В-лимфобластный лейкоз с t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH;
- В-лимфобластный лейкоз с t(1;19)(q23;p133); TCF3-PBX1;
- Т-лимфобластный лейкоз/лимфома, никак более не категоризированный.

В 2016 г. в результате двух рабочих совещаний (Clinical Advisory Committees) классификация ВОЗ 2008 г. была дополнена двумя нозологическими формами ОЛЛ:

- В-лимфобластным лейкозом с транслокацией, включающей гены тирозинкиназных рецепторов или цитокиновых рецепторов (BCR-ABL1-подобный острый лимфобластный лейкоз);
- В-лимфобластным лейкозом с интрахромосомной амплификацией хромосомы 21 (iAMP21).

Учитывая постоянное выявление новых генетических повреждений при ОЛЛ, не исключено, что вскоре в принятые классификации будут введены и другие ранее не известные опухоли мягких тканей. В соответствии с литературными данными, такими подтипами могут быть варианты патологии с генетическими аномалиями генов PAX5, NOTCH1, IKZF1, JAK1/2, CRLF2, активация киназного пути при Ph-подобном остром лимфолейкозе, CREBBP, NT5C2 и др.

ВОЗ классификация острых миелоидных лейкозов (2008г.):

ОМЛ с характерными цитогенетическими аномалиями

- ОМЛ с t(8;21) (q22; q22); *RUNX1 – RUNX1T1*

- ОМЛ с аномальной эозинофилией костного мозга, *inv(16)(16;16)(p13;q22); CBF/MYH11*
- Острый промиелоцитарный лейкоз с *t(15;17)(q22;q12); PML/RAR α* и его варианты
- ОМЛ с *t(9;11)(p2;q23); MLLT3-MLL*
- ОМЛ с *t(6;9); DEK-NUP214*
- ОМЛ с *inv(3)(q21;26.2)* или *t(3;3)(q21;26.2); RPN-EVI*
- ОМЛ (мегакариобластный) с *t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1*
- ОМЛ с мутацией *NPM1*
- ОМЛ с мутацией *CEBPA*

ОМЛ с мультилинейной дисплазией

- ОМЛ, развившийся на фоне МДС или миелопролиферативного заболевания
- ОМЛ, развившийся без предшествовавшего МДС

ОМЛ, обусловленный предшествовавшей химиотерапией

- ОМЛ, обусловленный экспозицией алкилирующих агентов
- ОМЛ, обусловленный экспозицией ингибиторов топоизомераз II типа
- ОМЛ, обусловленный экспозицией других препаратов

ОМЛ, не относящийся к вышеперечисленным категориям

- ОМЛ с минимальной дифференцировкой
- ОМЛ без созревания ОМЛ с созреванием
- Острый миеломоноцитарный лейкоз
- Острый монобластный и острый моноцитарный лейкоз
- Острый эрироидный лейкоз
- Острый мегакариоцитарный лейкоз
- Острый базофильный лейкоз
- Острый панмиелоз с миелофиброзом

Гематологические и системные клинические проявления гемобластозов

Костный мозг при лейкозах характеризуется изменением общего числа форменных элементов крови, относящихся к двум качественно разным типам

гемопозеза - нормальному и опухолевому, и увеличением числа делящихся гемопозэтических клеток гемобластоза («омоложение» состава гемопозэтических клеток), что сопровождается нарастанием количества атипичных бластных клеток. В ПК выявляется ряд характерных признаков: изменение общего количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, появление лейкоцитов различной степени зрелости (бластных, созревающих); анемия; тромбоцитопения.

Симптоматика острого лейкоза может быть разнообразной и основывается на четырех синдромах:

- *Гиперпластический синдром* обусловлен инфильтрацией бластными клетками лимфатических узлов, печени, селезенки, почек, миокарда, легких и других органов и характеризуется:
 - лимфаденопатия (регионарная или генерализованная);
 - гиперплазия миндалин, десен и язвенно-некротические изменения в полости рта обусловлена инфильтрацией бластными клетками подслизистого слоя (характерно для ОМЛ);
 - лейкемиды - инфильтраты лейкозных клеток в дерме в виде красновато-синеватых папулообразных бляшек;
 - гепато-, спленомегалия (более характерна для ОЛЛ);
 - поражение почек (гематурия, артериальная гипертензия, редко почечная недостаточность);
 - поражение сердца и легких обусловлено лейкемическими инфильтратами и кровоизлияниями, а также кровоизлияниями в миокард, перикард и ткань лёгких;
 - поражение костной ткани (оссалгии) связано со скоплением лейкемических клеток поднадкостнично, в костномозговых полостях и разрушением компактного вещества кости, что приводит к остеопорозу кортикальных и мозговых отделов, патологическим переломам и субпериостальным костным образованиям;

- поражение ЦНС (головная боль, тошнота, рвота, повышение АД, головокружение, нарушение зрения, походки) обусловлено диффузной инфильтрацией бластными клетками оболочек и вещества мозга (нейролейкоз).
- *Анемический синдром* (бледность кожи и слизистых, систолический шум, тахикардия, слабость, повышенная утомляемость, головокружения и др.) связан с угнетением нормального кроветворения при лейкозной гиперплазии и инфильтрации бластами КМ.
- *Геморрагический синдром* (петехеально-пятнистый тип кровоточивости (кровотечения носовые, десневые, маточные и др., экхимозы) обусловлен угнетением мегакариоцитарного ростка, тромбоцитопенией в крови и нарушением первичного гемостаза, при М₃- варианте часто развивается ДВС-синдром.
- *Интоксикационный синдром* (повышение температуры тела, астенизация, снижение аппетита и др.) обусловлен лизисом бластных клеток.

Принципы диагностики острого лейкоза

Верификация диагноза проводится с помощью цитологического и цитохимического исследования мазков КМ и периферической крови, мультипараметрической проточной цитофлюорометрии клеток КМ и цитогенетического и молекулярно-генетического анализа опухолевых лимфо- и миелобластов.

Основные мероприятия в диагностический период:

- первичный осмотр пациента с оценкой инфекционного статуса и инфекционного анамнеза, а также неврологического статуса, с клинической оценкой массы опухоли (размеры печени и селезёнки, оценка опухолевого лейкоцитоза);
- обеспечение венозного доступа и забора крови для исследования основных биохимических показателей (мочевина, креатинин, электролиты, общий белок, билирубин, глюкоза) и для цитологического анализа;
- рентгенография грудной клетки в прямой и в правой боковой проекциях;

- пункция КМ и забор КМ на цитологическое, цитохимическое, иммунологическое и молекулярно-биологическое исследования;
- люмбальная пункция с забором ликвора для цитологического исследования;
- УЗИ органов брюшной полости, ЭКГ, ЭХО-КГ;
- серологические (вирусологические) исследования: HBs, anti-HCV, CMV;
- коагулограмма (уровень фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновый индекс, МНО, D-димеры);
- трансфузия эритроцитов в случае выраженной анемии ($Hb < 70$ г/л; а в случае наличия инфекции, одышки, тахикардии, гипотонии при $Hb < 90$ г/л);
- трансфузия тромбоцитов при наличии геморрагического синдрома и/или при наличии тромбоцитопении $< 50 \cdot 10^9$ /л (учитывая необходимость проведения люмбальной пункции, катетеризации центральной вены).

Цитохимическое исследование опухолевых клеток является важным для дифференциальной диагностики с другими вариантами лейкоза. Две цитохимических реакции должны обязательно проводится для инициальной диагностики лейкоза - реакция на миелопероксидазу и реакция на неспецифическую эстеразу. Остальные реакции, включая исследование гликогена, определение кислой фосфатазы, анализ на TdT (терминальная дезокситрансфераза) и другие в силу развития методов проточной мультипараметрической цитометрии на сегодняшний день не имеют диагностического значения.

Мультипараметрическая проточная цитометрия, проводимая, прежде всего, с целью точного определения иммунофенотипа лейкоэмического клона занимает центральное место в диагностике острого лейкоза, являясь очень важным и обязательным методом для диагностики различных вариантов ОЛЛ и ОМЛ, для стратификации на группы риска и для последующего определения минимальной резидуальной болезни. Для исследования необходимы клетки нативного КМ в растворе антикоагулянта ЭДТА. Реакция прямой иммунофлюоресценции и анализ на проточном цитофлуориметре должны быть проведены не позднее, чем через сутки после взятия материала.

Цитогенетическое исследование лейкемических клеток должно включать в себя кариотипирование и исследование методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) для выявления характерных перестроек. Для кариотипирования необходимо исследовать не менее 25 метафаз, в которых производится посчёт хромосом и оценка их структуры.

Молекулярно-генетическое исследование клеток КМ проводится методом мультиплексной ПЦР. Минимальный набор маркёров при ОМЛ содержит *AML/ETO*, *CBF β -MYH11*, *PML-RAR α* , *MLL/AF4*, *MLL/AF9*, *MLL/ELL*, *MLL/AF1q*, *MLL/AF6*, *MLL/MLL*. Также методом прямого секвенирования рекомендуется исследовать активирующие мутации генов *Flt-3* и *C-kit*. При ОЛЛ для стратификации на группы риска необходимо обязательное определение наличия транслокаций t(9;22), t(4;11) и t(12;21). По возможности определение редких перестроек (гипоплоидный кариотип, внутривхромосомная амплификация хромосомы 21 – iAMP21, t(1;19), перестройки гена *MLL*, *IgH*, *CRLF2*, *ABL1*, *PDGFR β* , *JAK2*).

HLA-типирование пациента и членов его семьи с целью поиска донора для ТГСК проводится после восстановления гемопоэза после I блока химиотерапии при ОМЛ, в группе высокого риска ОЛЛ и при рецидивах ОЛЛ.

Критерии диагноза острого лейкоза: диагноз ОЛ ставится на основании обнаружения в пунктате КМ 20% и более лейкемических клеток, для которых с помощью мультипараметрической проточной цитометрии и данных цитохимии доказан один из вариантов лимфоидной или миелоидной дифференцировки бластных клеток. Диагноз ОМЛ также ставится независимо от процентного содержания бластных клеток при наличии патогномичных для ОМЛ хромосомных аномалий: t(8;21) (q22; q22) *AML/ETO*, t(15;17) (q12; q11-12) *PML/RAR- α* , inv(16) или t(16;16) (p12; q23) *CBF/MYH11*, t(1;22). Диагноз *de novo* ОМЛ правомочен, если в анамнезе нет указаний на предшествующие конституциональные расстройства, миелодиспластические и миелопролиферативные заболевания, а также на экспозицию потенциально лейкемогенных факторов - облучения и химиотерапии.

Диагноз нейролейкоза (инициальное поражение ЦНС) ставится на основании наличия бластных клеток в ликворе и/или наличия парезов черепно-мозговых нервов, не связанных с другими заболеваниями или повреждениями и/или наличия образования в ЦНС или оболочках по данным КТ/МРТ.

Критерии достижения полной ремиссии: 5% и менее бластных клеток в регенерирующем костном мозге; периферическая кровь с признаками регенерации, бластных клеток нет; отсутствие экстрамедуллярного поражения.

Диагноз рецидива ОЛЛ:

Костномозговой рецидив изолированный диагностируется при обнаружении в КМ 25% и более лимфобластов, без одновременного поражения ЦНС и/или другого экстрамедуллярного поражения (допустимо одновременно увеличение печени, селезенки, лимфоузлов или миндалин);

ЦНС-рецидив изолированный доказывается содержанием лимфобластов в ликворе при цитологическом исследовании, а также неврологическими симптомами, не связанными с другими заболеваниями и повреждениями. При внутричерепном образовании на КТ/МРТ и при отсутствии бластов в ликворе, крови и КМ, для диагностирования изолированного рецидива ЦНС необходимо получить гистологическое подтверждение или провести однофотонную эмиссионную КТ головного мозга. В КМ число бластных клеток должно составлять менее 5%.

Тестикулярный рецидив изолированный диагностируется при появлении одно- или двустороннего безболезненного увеличения яичка и значительного увеличения его плотности при пальпации (объем яичка с отклонением от нормы более чем на 2 единицы, измеряемое орхидометром Прадер) и требует гистологического подтверждения манифестации ОЛЛ в одном или двух яичках. Диагноз изолированного рецидива яичка ставится только в том случае, когда в костном мозге менее 5% лимфобластов и нет поражения ЦНС.

Особые локализации рецидивов: первичный рецидив в коже, кости, орбите, средостении, изолированном лимфоузле, миндалине, при этом пораже-

ние изолированно от КМ, ЦНС или яичек. Для постановки диагноза рецидива особой локализации необходимо подтверждение с помощью биопсии. В случае рецидива в сетчатке достаточно обнаружения при офтальмологическом обследовании специфической картины лейкоэмической инфильтрации.

Комбинированные рецидивы: сочетание двух и более поражений различной локализации. При комбинированных рецидивах КМ считается пораженным при наличии 5% и более лимфобластов.

По времени возникновения рецидивы подразделяю на очень ранний, ранний и поздний (таблица 15).

Таблица 15 – Тип рецидива по времени возникновения

Тип рецидива	Отношение к инициальному диагнозу	Отношение к окончанию поддерживающей терапии
Поздний	Не имеет значения	Более 6 месяцев
Ранний	Более 18 месяцев	Менее 6 месяцев
Очень ранний	Менее 18 месяцев	Менее 6 месяцев

Общие принципы терапии острого лейкоза

Лечение ОЛ осуществляется при помощи комбинаций цитостатических препаратов, вводимых внутрь, внутривенно и интратекально при строгом соблюдении дозы, длительности и времени введения согласно выбранному терапевтическому протоколу. Терапия должна быть начата как можно раньше, однако для начала терапии необходимо быть полностью уверенным в диагнозе и установить объем поражения. Точка приложения химиотерапевтических препаратов - внутриклеточный обмен лейкозной клетки, нарушение или прекращение синтеза жизненно важных субстанций, ведущих к её гибели. Лейкозные клетки составляют 2 субпопуляции: пролиферирующей пул (находящиеся в митотическом цикле и способны к делению) и непролиферирующий пул (находящихся в фазе покоя G_0). Основными группами лекарственных средств являются алкилирующие соединения, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, ферменты, глюкокортикостероиды, алкалоиды. Противолейкозные средства воздействуют прежде всего на лейкозные

клетки, однако оказывают влияние и на нормальные клетки различных органов и систем, обуславливая побочные проявления. По действию на клеточный цикл противоопухолевые средства разделены на 2 группы: нециклоспецифические препараты (не имеют избирательного действия на определенную фазу митотического цикла и вызывают гибель клетки в любой стадии цикла - глюкокортикостероиды, алкалоиды, алкилирующие соединения) и циклоспецифические препараты (имеют избирательное действие на определенную фазу митотического цикла - антиметаболиты, производные нитрозомочевины). Цитостатические препараты наиболее активны в отношении пролиферирующих лейкозных клеток. Однако, основную массу патологического субстрата (90%) составляет непролиферирующий пул. Поэтому одна из трудностей терапии острых лейкозов заключается в невозможности эффективного уничтожения покоящихся клеток (фаза G_0). В этой фазе гибель клеток вызывают нециклоспецифические препараты, однако они обладают высокой токсичностью по отношению к здоровым клеткам. Поэтому современная терапия острых лейкозов предполагает использование нескольких химиотерапевтических средств – полихимиотерапия (ПХТ). Эффективное уничтожение опухолевых клеток достигается за счет интенсивной длительной и комбинированной цитостатической терапии. Интенсивность терапии включает в свое понятие циклическое применение ударных доз на протяжении длительного времени. Комбинирование химиопрепаратов позволяет максимально воздействовать на опухолевые клетки в различных фазах митотического цикла, а соблюдение интервалов между курсами ПХТ - восстановить нормальный гемопоез и выйти лейкозным клеткам из фазы G_0 в митотический цикл. Поэтому при ПХТ соблюдаются следующие правила: назначение цитостатических средств, действующих на разные фазы клеточного цикла; сочетание препаратов, приводящих клетку к гибели в одной и той же фазе митотического цикла, но обладающих различным биохимическим механизмом; введение нескольких препаратов, не оказывающих одинакового побочного действия, во избежание усиления токсического эффекта.

Действие некоторых цитостатических препаратов (метотрексат, цитозар) при назначении в умеренной дозе и на короткий срок характеризуется определенной обратимостью. Под их влиянием клеточный цикл задерживается в фазе активного действия препарата. Через определенный период времени действие прекращается и клетка может продолжить митотический цикл. С помощью ПХТ можно добиться накопления массы делящихся лейкозных клеток в какой-либо одной митотической фазе, т.е. синхронизировать пролиферирующую субпопуляцию. Введение следующего химиопрепарата, наиболее активного в данной фазе клеточного цикла, оказывает значительный цитостатический эффект. Таким образом, терапия состоит из трех этапов: введение цитостатического препарата, блокирующего клетки в определенной стадии митотического цикла; накопление клеток в фазе блока и синхронный переход в следующую митотическую фазу; действие цитостатического фазо-специфического препарата.

Современное лечение ОЛЛ состоит из нескольких основных фаз: индукция ремиссии, мультиагентная консолидация («закрепление») ремиссии и поддерживающая терапия, как правило, антиметаболитами; общая длительность лечения составляет 2-2,5 года. Обязательным компонентом является профилактика и лечение нейтролейкемии, для чего протоколом предусмотрено интратекальное введение химиопрепаратов (метотрексат, цитозар, преднизолон) в возрастных дозировках. Терапия ОМЛ традиционно базируется на применении антрациклинов и цитарабина. Суммарные дозы основных химиопрепаратов переменны и зависят от протокола лечения и прогностической группы. Современный протокол терапии ОМЛ включает основные фазы (индукция ремиссии и консолидация ремиссии); лечение и профилактику поражения ЦНС тремя препаратами (метотрексат, цитарабин, преднизолон); проведение терапии НК-клетками от гаплоидентичного KIR-аллореактивного донора пациентам промежуточной группы риска в режиме рандомизации; применение сорафениба у пациентов высокой группы риска с мутацией FLT3-ITD; проведение аллогенной ТГСК в первой ремиссии пациентам вы-

сокой группы риска; проведение ТГСК от гаплоидентичного донора с TCR $\alpha\beta$ деплецией пациентам высокой группы риска при отсутствии подходящего совместимого родственного и неродственного донора; определение необходимого количества курсов полихимиотерапии перед ТГСК пациентам высокой группы риска в зависимости от значения МОБ, выявляемой многопараметрической проточной цитометрией

Перспективы оптимизации лечения ОМЛ связаны с трансляция знаний о молекулярных aberrациях в плоскость таргетной терапии и обусловлены необходимостью улучшения результатов лечения ОМЛ у детей, поскольку дальнейшая интенсификация существующей ПХТ не представляется возможной ввиду серьезных осложнений и высокой летальности. Некоторые новые таргетные препараты уже начали изучаться в рамках клинических исследований ОМЛ у детей. Рецепторная тирозинкиназа FLT3, которая экспрессируется на поверхности бластов CD34 и ранних предшественников, играет ключевую роль в процессе клеточной пролиферации и дифференцировки и является широко исследуемой мишенью таргетной терапии. Ингибиторы FLT3 – лестауртиниб (СЕР-701), мидостаурин (РКС412), квизартиниб (АС220) и, наконец, сорафениб находятся в активной фазе исследований при ОМЛ у младенцев (20–25 % ОМЛ у детей первых 2 лет жизни), детей и взрослых. Тирозинкиназные ингибиторы, направленные на ингибирование активации гена FLT3, в этом смысле являются наиболее хорошо изученным подходом в лечении детского ОМЛ, что основано на изучении РКС412, СЕР-701, АС220 и сорафениба в программном лечении ОМЛ. Эксперты Детской онкологической группы США (Children's Oncology Group, COG) рекомендовали включение сорафениба в остром периоде ОМЛ в сочетании с ПХТ и в поддерживающей фазе в качестве монотерапии в течение года. Тем не менее на сегодняшний день нет убедительных рандомизированных исследований, показывающих увеличение общей выживаемости пациентов с мутацией FLT3, получающих подобную терапию. Другими потенциальными целями при ОМЛ являются мутации генов KIT и RAS. Группа пациентов с мутацией

КІТ включает в себя также иматиниб-резистентных пациентов с мутацией D816V/Y, чувствительной к дазатинибу. Завершилась I фаза исследований по применению дазатиниба у детей. Продолжается исследование по применению дазатиниба совместно с ПХТ при ОМЛ у взрослых. При ОМЛ с реаранжировкой MLL усилия направлены на разработку таргетной терапии, например идут исследования ингибирования DOT1L, который является частью MLL-комплекса. Надо отметить, что эти ингибиторы (DOT1L), похоже, также имеют активность в отношении t(6;11)(q27;q23)-позитивных клеток с нехваткой DOT1L в основном комплексе, что может говорить об активности этого препарата в отношении aberrантного метилирования H3K79. Гемтузумаб озогамидин представляет собой конъюгированное моноклональное антитело против CD33 в соединении с цитостатическим агентом и поскольку опухолевые клетки ОМЛ экспрессируют CD33, то, таким образом, они являются таргетами для данного препарата. Начальные исследования III стадии не показали значительного улучшения в бессобытийной и общей выживаемости при детском ОМЛ, но известно о позитивном результате в отношении рефрактерных и рецидивировавших пациентов, кроме того, отмечена его эффективность в снижении уровня МОБ после проведения таргетной терапии. Антитела к CD33 (экспрессируются на 80–90 % бластных клеток при детском ОМЛ) в сочетании с противоопухолевым антибиотиком калихеамицином (гемтузумаб) использовались в сочетании со стандартной ПХТ у взрослых и детей. Улучшение 3-летней бессобытийной выживаемости у пациентов ОМЛ сопровождалось повышением смертности взрослых, а не детей, что послужило основанием для снятия препарата с продаж в США в 2010 г. У детей экспериментальная терапия была продолжена и отчеты по исследованиям дают шанс на возрождение препарата в комбинированной терапии ОМЛ. Ведутся исследования с использованием анти-CD33 в виде биспецифических антител (анти-CD33 и CD3). Другая стратегия направлена на антиген CD123, трансмембранный рецептор альфа-цепи IL3, который преимущественно локализуется на лейкемических клетках. CD123 также исследуется как мишень для

клеточной терапии антигенным Т-клеточным рецептором. Еще одной мишенью для Т-клеточного антигенного химерного рецептора является экспрессия фолатного рецептора β .

Появление на рынке новых цитостатиков автоматически начинает круг исследований по их комбинации со «старыми» химио- и новыми таргетными препаратами. Клофарабин является пуриновым нуклеозидным антиметаболитом, используемым при рецидиве или рефрактерном течении детского ОМЛ. Комбинация клофарабина с цитарабином у детей с рефрактерным или рецидивирующим течением ОМЛ показала свою результативность у 48 % ответивших пациентов; 3-летняя общая выживаемость составила 46 %. В продолжающихся исследованиях флударабин, применяемый в режиме терапии FLAG, состоящей из флударабина, цитарабина и G-CSF, был заменен клофарабином в комбинации с циклофосфамидом и этопозидом. Другое исследование II фазы показало улучшенные результаты при использовании комбинации клофарабина, топотекана, винорелбина и тиотепы у детей с рефрактерным или рецидивирующим ОМЛ. Терапия ОМЛ с применением децитабина – гипометилирующего агента и цитарабина показала большую эффективность в отличие от монотерапии цитарабином. Низкодозный децитабин назначался пациентам с высоким риском развития рефрактерности или рецидива и 3/8 от общего числа пациентов ответили на данную терапию. Еще один гипометилирующий агент азацитидин, возможно, будет характеризоваться менее выраженными побочными эффектами. ОМЛ, как и многие виды опухолей, демонстрируют aberrантную активность одного из ключевых путей сигнальной трансдукции, влияющих на пролиферацию клеток – серин/треонин киназу (mTOR), которую способны заблокировать рапамицин (сиролимус) или его аналоги (темсиролимус, эверолимус). Лечение рапамицином блокирует клеточный цикл в G0/G1-клеточных линиях ОМЛ, но клинический эффект у взрослых с рецидивирующим/рефрактерным ОМЛ дал скромные результаты. У детей эта группа препаратов при ОМЛ не применялась. Имеются данные об использовании сиролимуса для лечения реакции

«трансплантат против хозяина» у пациентов, получивших ТГСК. Результаты исследования у детей показали, что сиролimus снизил частоту развития острой реакции «трансплантат против хозяина», но показатели выживаемости не улучшились.

При ОМЛ, как и ряде других лейкозов, исследованию подвергается сигнальная система янус-киназы (JAK-сигнального белка-трансдуктора и активация транскрипции (STAT). Руксолитиниб – ингибитор JAK/STAT находится в I фазе клинических испытаний COG. У взрослых при ОМЛ с FLT3-мутациями, сочетание ингибиторов JAK и ингибиторов FLT-3 (пакритиниб) исследуется во II–III фазе исследований (ClinicalTrials.gov – NCT02055781). Перспективной терапевтической опцией при ОМЛ является использование ингибиторов протеасом, таких как бортезомиб и карфилзомиб. Бортезомиб изучался COG во II/III фазах при детском ОМЛ в сочетании со стандартной ПХТ, но результаты еще не опубликованы. Консорциум ROETIC планирует изучение I фазы исследований карфилзомиба, дающего более высокий уровень ингибирования протеасом у детей с рецидивирующим/рефракторным ОМЛ.

Эпигенетические модификации с ингибированием гистондеацетилазы (HDAC) или ДНК-метилтрансферазы (DNMT) также исследуются в комбинации с традиционной ПХТ в лечении ОМЛ высокого риска. Азацитидин, вориностат и их сочетание одобрены Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (Food and Drug Administration, FDA) для исследования у взрослых. У детей в экспериментальных протоколах используется вориностат. Недавно открыта I фаза испытаний по переносимости нового HDAC-ингибитора – панобиностата у детей с рефрактерными опухолями. При младенческих лейкозах 60–80 % опухолевых клеток содержат перестройки гена MLL, стандартная ХТ у этой группы больных неэффективна. Когда было доказано, что различные MLL-гибридные белки образуют совокупность с дизраптором теломерной передачи сигнала, метилтрансферазой DOT1L, появилась возможность использо-

вать ингибитор DOT1L-EPZ004777, что послужило основанием для таргетирования DOT1L при лейкозе с MLL-r. В настоящее время ведется исследование (ClinicalTrials.gov – NCT01684150) эффективности этого вида эпигенетического таргетирования.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при ОЛЛ у детей показано всем пациентам высокого риска в 1-ой ремиссии и пациентам с рецидивами ОЛЛ (за исключением пациентов с поздними изолированными экстрамедуллярными рецидивами) при условии обнаружения родственного полностью совместимого донора. Пациентам, не достигшим ремиссии после проведения индукционной терапии, облигатно показана аллогенная ТГСК любого типа (в зависимости от доступности доноров и от технических возможностей). ТГСК при ОМЛ проводится пациентам группы высокого риска (наличие FLT3-ITD; 11q23, кроме t(9;11) и t(1;11); t(8;21) с мутацией c-kit; моносомии 7, моносомии 5; варианта М7, М6; t(6;9); inv3, t(3;3); сложного кариотипа (5 и более аномалий); при резистентных ОМЛ (без выхода в ремиссию после проведения двойной индукции).

Бифенотипический лейкоз является достаточно редкой формой острого лейкоза, для которой не разработано схем ПХТ. Пациенты получают ПХТ согласно группе риска, определяемой по совокупности данных клиники, морфологии, цитохимии, цитогенетики и иммунофенотипирования.

Для адекватного выполнения терапевтического протокола при острых лейкозах необходимо строгое соблюдение принципов сопроводительной терапии: профилактика синдрома лизиса опухоли; своевременное замещение препаратами крови; профилактика инфекций; адекватная интенсивная терапия развившейся инфекции; адекватное питание (при необходимости парентеральное); тщательное соблюдение баланса жидкости; антиэметическая профилактика и терапия; контроль и тщательный уход за центральным венозным катетером.

2.4. ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОЛЕЙКОЗ

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – клональное миелопролиферативное заболевание поражающее в полипотентную стволовую клетку. ХМЛ у детей встречается редко и составляет менее 3% из всех лейкозов детского возраста. Заболеваемость увеличивается с возрастом и составляет 0,7 на 1 млн детского населения в возрасте 1–14 лет, 1,2 на 1 млн в возрастной группе 15–19 лет. В литературе описаны только три случая ХМЛ у детей младше 4 лет. По данным международного регистра ХМЛ у детей и подростков в 2012 г. медиана возраста соответствует 11,6 годам (8 мес – 18 лет).

Согласно ВОЗ классификации миелоидных опухолей (2008 г.) ХМЛ включен в группу миелопролиферативных опухолей как хронический миелолейкоз, BCR-ABL1- позитивный. Впервые ХМЛ был описан в 1845г. английским врачом Джоном Беннетом. Это первое распознанное злокачественное заболевание, имеющее специфическую хромосомную аномалию. После открытия в 1960 году хромосомы, теперь известной как Филадельфийская (Ph) хромосома, было определено, что она является результатом реципрокной транслокации t(9;22) между хромосомами 9 и 22. В эту транслокацию, вовлечены ABL1 (Abelson) прото-онкоген 9-й хромосомы и BCR (breakpoint cluster region – точка перелома кластера региона) ген 22-й хромосомы. В итоге на 22-й хромосоме (Ph-хромосома) образуется химерный ген BCR/ABL, который кодирует белок, обладающий высокой тирозинкиназной активностью – p210 BCR-ABL. Этот протеин активирует рост и дифференцировку гемопоэтических клеток. В свою очередь, ген BCR инициирует процесс трансформации гемопоэтических клеток в злокачественные, делая их рост и выживаемость независимыми от цитокинов. В начальной стадии ХМЛ стволовая клетка полностью управляется геном BCR-ABL, но сохраняет способность к дифференцировке. Её зрелая клеточная популяция полноценно функционирует. В дальнейшем, происходит необратимая трансформация клетки в более агрессивную вследствие нестабильности генома, вызванной самим геном BCR-ABL. По мере прогрессии заболевания в организме накапливаются не-

зрелые предшественники гранулопоэза, образуются экстрамедуллярные очаги гемопоэза в различных органах и тканях, а так же подавляется эритропоэз и мегакариоцитопоэз. Перечисленные характерные нарушения являются результатом усиления пролиферативной активности клеток, блокирования процессов апоптоза, прогрессирующего нарушения дифференцировки и нарушения процессов миграции клеток КМ, которые спровоцированы клональной эволюцией.

Клинически ХМЛ в своем развитии проходит три фазы: хроническую, фазу акселерации и фазу бластного криза. На момент выявления ХМСЛ структура пациентов в хронической фазе, фазах акселерации и бластного криза составляет 80%, 15% и 5% соответственно. В хронической фазе течение заболевания сравнительно доброкачественное. Самочувствие, как правило, удовлетворительное. Клиническая картина болезни по мере прогрессии ХМЛ резко ухудшается и в фазе акселерации и бластного криза характеризуется глубокой тромбоцитопенией с геморрагическими осложнениями, анемией, опухолевой интоксикацией с лихорадкой, выраженной слабостью и болями в костях и/или в брюшной полости вследствие органомегалии. При ХМЛ причиной летального исхода, как правило, являются геморрагические или инфекционные осложнения, а также полиорганная недостаточность вследствие опухолевой интоксикации и появления экстрамедуллярных очагов гемопоэза. Фаза бластного криза напоминает острый лейкоз и обладает высокой рефрактерностью к химиотерапии – процент ответа на терапию составляет около 20%. Точное установление фазы заболевания необходимо для выбора правильной стратегии лечения. В современной литературе предлагаются различные критерии для определения фазы ХМЛ. В детской практике применяют рекомендации ELN (European Leukemia Net), адаптированные М.Вассарани et al. в 2006 г. (таблица 16). Для ХМЛ типичны следующие клинико-гематологические признаки: увеличение селезенки; лейкоцитоз $>10 \cdot 10^9/\text{л}$; циркуляция в периферической крови незрелых форм гранулоцитов (миелобластов, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов); повышение

количества циркулирующих в крови базофилов и эозинофилов $>5\%$; тромбоцитоз $>450 \cdot 10^9/\text{л}$; анемия $< 100 \text{ г/л}$; отсутствие моноцитоза $> 1000/\text{мкл}$. Выше перечисленные признаки позволяют заподозрить ХМЛ, однако подтверждается диагноз обнаружением Ph (+) хромосомы при рутинном цитогенетическом анализе, транслокации t(9;22) (q34;q11.2), методом FISH или обнаружением РНК химерного гена BCR/ABL1 методом ПЦР.

Таблица 16 – Критерии диагностики фазы ХМЛ

Хроническая фаза	Нет признаков акселерации и бластного криза Бласты ПК и КМ $>10\%$, $<30\%$
Фаза акселерации	Бласты + промиелоциты в ПК или КМ $> 20\%$ Тромбоциты $<100\ 000/\text{мкл}$ Дополнительные цитогенетические aberrации
Бластный криз	Бласты ПК и КМ $> 30\%$ Любая экстрамедуллярная инфильтрация бластными клетками, за исключением селезенки, лимфоузлов, печени

Кариотип клеток оценивается в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально окрашенных хромосом ISCN (1995). При стандартном цитогенетическом исследовании Ph-хромосому обнаруживают более чем у 95% пациентов ХМЛ. Кроме стандартной Ph-хромосомы у 3-8% пациентов с ХМЛ определяются варианты t(9;22) с вовлечением в перестройку одного и более дополнительных участков 9 и 22 хромосом. Различают простые и сложные варианты транслокации t(9;22). В случае простых вариантов транслокаций, цитогенетически вовлекаются две хромосомы: 22 и любая другая, кроме 9. Несмотря на различные комбинации хромосом, определяемые при цитогенетическом исследовании, на молекулярном уровне варианты t(9;22) приводят к образованию химерного BCR-ABL гена, как в случае со стандартной Ph- хромосомой. При ХМЛ в 20-40% случаев наблюдаются дополнительные хромосомные аномалии. Из них чаще всего встречаются: трисомия 8-й хромосомы (30-40% случаев), дополнительная 22-я хромосома (20-30% случаев) и изохромосома 17 (15-20% случаев). Течение

болезни и клиническая картина почти не отличаются у больных Ph- позитивным/BCR-ABL-позитивным и Ph-негативным/BCR-ABL-позитивным ХМЛ. При некоторых видах вариантных транслокаций, когда в патологический процесс наряду с 9-й и 22-й вовлечены другие хромосомы может иметь место маскировка Ph-хромосомы. Точка разрыва на 9-й хромосоме при транслокации t(9;22)(q34;11) строго фиксирована и возникает на 3' участке гена ABL (экзон a2). Разрыв на 22-й хромосоме у преобладающего большинства случаев ХМЛ происходит в большой M-bcr зоне в области экзонов e13 и e14, известных также как b2 и b3. Оба транскрипта (e13a2 = b2a2 и e14a2 = b3a2) слитного гена BCR-ABL кодируют образование белка размером 210 kDa – p210 BCRABL. Редко при ХМЛ выявляются и другие транскрипты гена BCR-ABL такие как e1a2, e19a2, e1a3. Тем не менее, у 10–15% пациентов с ХМЛ одновременно с транскриптами b2a2 или b3a2 может определяться слабая ко-экспрессия e1a2 транскрипта гена BCR-ABL. Однозначных данных о прогностическом значении разных транскриптов гена BCRABL не получено. У пациентов с экспрессией белка p190 BCR-ABL (транскрипт e1a2) заболевание протекает более агрессивно. Вариант транскрипта гена BCR-ABL определяют с помощью качественного анализа ПЦР, а его уровень – методом количественного анализа. Качественный анализ ПЦР в повседневной клинической практике применяют довольно редко, в связи с тем, что тактика ведения пациента не зависит от вида транскрипта гена BCR-ABL, однако, он может быть полезным на этапе диагностики ХМЛ, в случае, когда стандартный цитогенетический анализ оказался неполноценным (не получены митозы или их анализ затруднен из-за плохого качества, вариантные транслокации с маскировкой Ph-хромосомы и др.) и отсутствует возможность проведения FISH-анализа.

При определении экспрессии гена BCR-ABL с помощью метода количественной ПЦР, как правило, используют праймеры к стандартным вариантам гена BCR-ABL. Тем не менее, данный количественный анализ не способен выявить редкие варианты транскрипта гена BCR-ABL. Показанием для

исследования качественной ПЦР и поиска редких транскриптов данного гена является ложно-отрицательный результат определения транскрипции гена BCR-ABL при достоверной количественной ПЦР (РНК не разрушена, достаточно копий контрольного гена). При сомнительных результатах стандартного цитогенетического и ПЦР исследования (редкие транскрипты гена) для уточнения диагноза ХМЛ необходимо использовать метод FISH, при котором флуоресценция в зоне химерного гена BCR-ABL возникает независимо от вида транскрипта. Кроме того, только данный анализ позволяет выявить делецию 9-й хромосомы.

Диагностический алгоритм при ХМЛ:



По иммунологическому фенотипу бластов выделяют семь вариантов бластного криза: миелоидный, лимфоидный, моноцитарный, эритроидный, мегакариоцитарный, недифференцированный и смешанный. Наиболее часто (у 60% пациентов) опухолевые клетки имеют миелоидную природу, у 20% - лимфоидную, у 5% - экспрессируют антигены эритроидных и мегакариоцитарных клеток. В 15% случаев фенотип клеток свойственен острому недифференцированному лейкозу. Причина гетерогенности маркеров бластных клеток при ХМЛ заключается в поражении стволовой кроветворной клетки. На момент диагностики ХМЛ лейкоэмическая популяция клеток достигает нескольких триллионов и составляет почти 90% всех гемопоэтических клеток.

Несмотря на то, что два клона клеток – здоровые и мутировавшие, длительное время сосуществуют, постепенно лейкемические клетки почти полностью вытесняют нормальные.

Основной целью терапии ХМЛ является достижение стойкой молекулярной ремиссии. Стратегия лечения ХМЛ кардинальным образом изменилась после внедрения препаратов – ингибиторов тирозинкиназы. Показания к проведению ТГСК, до недавнего времени считавшейся единственным радикальным методом лечения у пациентов с ХМЛ, стали более ограниченными. Иматиниб как ингибитор тирозинкиназы блокирует нарушение процессов внутренней сигнальной трансдукции. Иматиниб влечет на ключевые точки патогенеза ХМЛ, блокируя тирозинкиназу, тем самым подавляя пролиферацию Ph-позитивного клона клеток. С момента включения иматиниба в первую линию лечения ХМЛ у детей и подростков началось активное изучение прогностических факторов, важным из которых является ответ на лечение, определяемый не только клинически, но и с помощью оценки МОБ. Основными мишенями для определения и мониторинга МОБ при ХМЛ являются химерные онкогены. Значение МОБ позволяет оценить степень ответа на терапию в определенные сроки, прогнозировать течение и исход заболевания (таблица 17).

Таблица 17 – Критерии ответа на лечение ХМЛ

Гематологический ответ	Полный: Лейкоциты $<10 \times 10^9/\text{л}$ Базофилы $<5\%$ Тромбоциты $<450 \times 10^9/\text{л}$ Отсутствие миелоцитов, промиелоцитов, бластов
Цитогенетический ответ, % Ph+ метафаз	Полный – 0% Частичный – 1–35% Малый – 36–65%
Молекулярный ответ	Полный – транскрипт не определяется в 2 последовательных образцах (чувствительность $>10^4$) Большой – отношение BCR/ABL к ABL $<0,1\%$ (по интернациональной шкале)

Оптимальный ответ является хорошим индикатором для продолжения терапии иматинибом, а при субоптимальном и недостаточном ответах необходима смена тактики лечения. Выбор стартовой дозы иматиниба при лечении ХМЛ у детей зависит от фазы заболевания. Инициальные ежедневные дозы препарата 260–340 мг/м² у детей сопоставимы с дозами 400–600 мг в день у взрослых пациентов. Рекомендуемая стартовая доза иматиниба при лечении хронической фазы ХМЛ у детей и подростков составляет 300 мг/м² (максимально 400 мг в сутки), в фазу акселерации – 400 мг/м² (максимально 600 мг в сутки), а в фазу бластного криза – 500 мг/м² (максимально 800 мг в сутки).

Оценка результатов лечения в различных клинических исследованиях показала, что благодаря использованию иматиниба в первой линии лечения ХМЛ в хронической фазе у детей удается достичь не только стойкой клинико-гематологической ремиссии, но и глубокой молекулярной ремиссии. Степень ответа на лечение иматинибом служит ранним косвенным маркером выживаемости. Согласно рекомендациям ELN (2013), оптимальным ответом после начала терапии служит достижение полного гематологического ответа через 3 месяца; полного цитогенетического ответа через 6 месяцев; большого молекулярного ответа (BCR/ABL <0,1%) через 12 месяцев. Мониторинг цитогенетического ответа рекомендуется проводить каждые 6 месяцев, молекулярного ответа – каждые 3 месяца. Частичный ответ на лечение характеризуется наличием частичного гематологического ответа к 3 месяцам; малого или минимального цитогенетического ответа (Ph+ клетки >35%, но < 95%) к 6 месяцам; отсутствие полного цитогенетического ответа (Ph+ клетки > 0%) к 12 месяцам; отсутствие большого молекулярного ответа к 18 месяцам. Отсутствие эффекта терапии иматинибом определяется отсутствием гематологического ответа, прогрессированием к 3 месяцам; отсутствием полного гематологического ответа к 6 месяцам; отсутствием большого цитогенетического ответа (Ph+ клетки >35%) к 12 месяцам; отсутствием полного цитогенетического ответа к 18 месяцам.

нетического ответа (Ph+ клетки > 0%) к 18 месяцам; развитием резистентности, что определяется как потеря полного гематологического, цитогенетического ответа (должно быть подтверждено в 2 повторных анализа) или прогрессирование и развитие фазы акселерации и бластного криза. Это состояние высокого риска прогрессирования ХМЛ, которое требует рассмотрения вопроса о проведении аллогенной ТГСК от геноидентичного или альтернативного донора и/или назначения препаратов второй линии (нилотиниб, дазатиниб).

При достижении частичного ответа следует повысить дозу иматиниба до 520 мг/м². При недостижении оптимального ответа через 3 месяца терапии повышенными дозами необходим переход на ингибиторы тирозинкиназ 2-го поколения (дазотиниб, nilотиниб, бозутиниб) и планирование аллогенной ТГСК. В настоящее время строгих критериев выбора того или иного ингибитора 2-го поколения (нилотиниба, дазатиниба) при лечении пациентов в хронической фазе ХМЛ не существует. При выполнении мутационного анализа и выявлении мутаций гена BCR/ABL целесообразно назначение ингибитора, к которому данная мутированная форма гена является более чувствительной. У пациентов в фазе акселерации или бластном кризе ХМЛ при отсутствии противопоказаний препаратом выбора является дазатиниб. В любом случае у детей с ХМЛ резистентных к иматинибу главным методом лечения является ТГСК. Результаты ТГСК являются наилучшими при ее проведении в хроническую фазу ХМЛ в течение первого года от момента заболевания. Однако четких критериев в прогностическом отношении по срокам и необходимости проведения трансплантации у детей с ХМЛ нет. Принятие решения в пользу ТГСК базируется на балансе между риском развития тяжелых посттрансплантационных осложнений и прогрессированием заболевания в каждом конкретном случае. Предшествующий прием иматиниба не влияет на результаты выживаемости после ТГСК. Неутешительными являются результаты 5-летней выживаемости у детей с ХМЛ, трансплантируемых в фазу акселерации (около 30%). Однако нет данных по кинетике МРБ и необходимости

приема иматиниба после ТГСК у детей. Известно также, что высокая вероятность развития хронической реакции «трансплантат против хозяина» и состояний, связанных с самой процедурой ТГСК, повышает риск развития вторичных опухолей, снижает качество жизни и общую выживаемость. Все это лимитирует широкое применение ТГСК у детей с ХМЛ в первой линии лечения.

Глава 3

ГЕМОСТАЗИОПАТИИ

3.1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И СИСТЕМАТИЗАЦИЯ ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

Гемостаз представляет собой биологическую систему, обеспечивающую предупреждение и остановку кровотечения путем поддержания целостности стенок кровеносных сосудов и быстрого локального тромбообразования при сохранении жидкого состава крови. Внутрисосудистое тромбообразование - физиологический защитный процесс, который в норме всегда происходит только локально. Гемостаз управляется сложной системой нейрогуморальной регуляции, в которой четко функционируют механизмы обратной связи, вследствие чего сначала подвергается активации свертывание, а затем нарастает антитромботический потенциал. Эти механизмы создают условия для самоограничения процесса свертывания.

Функционирование системы гемостаза реализуется взаимодействием его основных компонентов: стенкой кровеносного сосуда, клетками крови и плазменными системами (свертывающей, антикоагулянтной, фибринолитической). В структурно-функциональной связи выделяют два звена системы гемостаза - первичный (сосудисто-тромбоцитарный гемостаз), в котором ведущая роль принадлежит тромбоцитам и микрососудам (диаметром до 100 мкм) и вторичный (коагуляционный гемостаз), когда происходит формирование и закрепление в сосудах фибриновых сгустков.

Клиническая характеристика патологии системы гемостаза

Основными клиническими признаками заболеваний, обусловленных нарушением системы гемостаза, являются или тромбозы, или склонность к повторным кровоизлияниям и кровотечениям, возникающим как спонтанно, так и под влиянием незначительных травм. Патология системы гемостаза, характеризующаяся повышенной склонностью к развитию тромбозов кровеносных сосудов и ишемией органов, определяются термином «тромбофи-

лия». В настоящее время выделено большое число первичных (генетически обусловленных) и вторичных (приобретенных, симптоматических) тромбофилий, отличающихся друг от друга по этиологии, характеру нарушений в системе гемостаза, осложнениям и прогнозу. Клинически тромбофилии характеризуются повышенной склонностью к развитию тромбов в сосудах различной локализации. В зависимости от того, насколько полно тромб перекрывает просвет сосуда, тромбозы подразделяют на окклюзивные и неокклюзивные. Среди последних выделяют неокклюзивный пристеночный тромб и флотирующий.

Окклюзивным называют такой тромб, который полностью выполняет просвет вены, из-за чего кровоток в ней отсутствует. Неокклюзивный пристеночный тромб характеризуется тем, что он фиксирован к одной из стенок вены. Наиболее опасным в плане развития тромбоэмболии является флотирующий («плавающий») тромб, который лишь у своего основания имеет точку фиксации к стенке сосуда, а на остальном протяжении со всех сторон омывается кровью. Клинические проявления тромбозов многообразны: от полного их отсутствия до инфаркта органов. Нередко на начальной стадии заболевания единственным проявлением тромбоза служит болевой синдром различной локализации и интенсивности или признаки нарушения микроциркуляции в органах с их дисфункцией. Тромбозы периферических сосудов конечностей проявляют себя тромбогеморрагиями и появлением некрозов кожи.

С другой стороны, нарушение гемостаза может проявлять себя геморрагическим синдромом, который клинически характеризуется пятью типами кровоточивости. Петехиально-пятнистый (синячковый) тип (рис. 2.1) характеризуется мелкими безболезненными точечными или пятнистыми геморрагиями, не напряженными и не расслаивающими ткани, которые провоцируются травмированием микрососудов (трением и давлением элементами одежды, легкими ушибами и т.п.). Клинически проявляется безболезненными кровоизлияниями в кожу, слизистые оболочки, кровотечениями из сосудов

мелкого калибра (десневыми, носовыми, почечными, маточными и т.п.). Этот тип кровоточивости сопровождается тромбоцитопенией и тромбоцитопатией. Гематомный тип кровоточивости (рис. 2.2) возникает при патологии коагуляционной системы крови, проявляется массивными, глубокими, напряженными и болезненными кровоизлияниями в мягкие ткани, в том числе в мышцы, подкожную и забрюшинную клетчатку, в брюшину, в суставы с их деформацией, повреждением хрящевой, костной ткани и нарушением функции. Характерен для коагулопатий. Смешанный (синячково-гематомный) тип кровоточивости характеризуется сочетанием признаков двух описанных выше видов геморрагического синдрома, часто встречается при вторичных геморрагических диатезах, связанных с синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания, поражениями печени, передозировкой антикоагулянтов и фибринолитиков.

Васкулитно-пурпурный тип кровоточивости (рис. 2.3), характеризующийся геморрагиями в виде сыпи или эритем, обусловлен воспалительными изменениями в микрососудах и периваскулярной ткани (иммунные поражения сосудов, инфекции). Геморрагии возникают на фоне местных экссудативно-воспалительных изменений, в связи с чем элементы сыпи возвышаются над уровнем кожи, уплотнены, нередко окружены ободком пигментированной инфильтрации, в некоторых случаях некротизируются.

Ангиоматозный тип кровоточивости (рис. 2.4) возникает при сосудистых дисплазиях (телеангиоэктазии и микроангиоматозы) и отличается упорными, повторяющимися кровотечениями из дисплазированных сосудов. Наиболее часты обильные носовые кровотечения.

Классификация патологии системы гемостаза

Все патологические состояния, связанные с нарушением системы гемостаза, можно систематизировать по группам в зависимости от причин возникновения, механизмов развития и преимущественного поражения его компонентов. По этиологии эти нарушения могут быть приобретенными и наследственными, а по направленности изменений подразделяться на пони-

жение (гипокоагуляцию) и повышение свертывания крови (гиперкоагуляцию), которое, в свою очередь, может быть локальным или генерализованным. Однако единой международной классификации патологии системы гемостаза не существует.

Общепринято выделение групп гемостазиопатий по этиопатогенезу и клиническим проявлениям: геморрагические диатезы, тромбофилии и тромбогеморрагические синдромы. Подобная клиническая систематизация применима для практического врача только в начале диагностического поиска. Для установления конкретной нозологической формы необходимо иметь представление о всех этиопатогенетических видах геморрагических и тромбофилических заболеваний.

Классификация патологии системы гемостаза

I. ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ДИАТЕЗЫ

1. Тромбоцитопении

1.1. Наследственные и врожденные:

- 1.1.1. обусловленные недостаточным числом мегакариоцитов в костном мозге (синдром Вискотта-Олдрича, «изолированная» тромбоцитопения, TAR - синдром, синдром Бернара-Сулье, аномалия Чедиака-Хигаси, синдром Фанкони и др.)
- 1.1.2. обусловленные неэффективным тромбоцитопозом вследствие дефекта синтеза тромбопоэтина или дистрофии мегакариоцитов (циклическая амегакариоцитарная тромбоцитопения, аномалия Мея-Хегглина синдром Альпорта и др.)

1.2. Приобретенные:

- 1.2.1. обусловленные снижением продукции тромбоцитов в костном мозге (апластические анемии, миелодиспластические синдромы, лейкозы, лейкемизация злокачественных новообразований, дефицит витамина В12 и фолиевой кислоты, экзогенная или эндогенная интоксикация: химические вещества, медикаменты, ионизирующее облучение, алкоголь, уремия и т.п.)

- 1.2.2. обусловленные внекостномозговой повышенной деструкцией тромбоцитов: иммунные тромбоцитопении, неиммунные (синдром гиперспленизма при циррозе печени, портальной гипертензии, гистиоцитозах, болезнях накопления, болезни Гоше, синдроме Фелти, туберкулезе селезенки, миелопролиферативных заболеваниях, талассемии и др., механические повреждения тромбоцитов при протезировании клапанов сердца, экстракорпоральном кровообращении)
- 1.2.3. обусловленные повышенным потреблением тромбоцитов (синдром ДВС, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, тромбозы, гемангиомы и т.п.)

2. Тромбоцитопатии

2.1. Наследственные и врожденные:

- 2.1.1. Дефицит или аномалии гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов (синдром Бернара-Сулье, тромбастения Гланцмана, синдром Аахуса и др.)
- 2.1.2. Дефекты активации тромбоцитов (синдром «серых» тромбоцитов, синдром Германского – Пудлака, синдром Чедиака-Хигаси, аспириноподобный синдром, дефект δ –гранул тромбоцитов и др.)
- 2.1.3. Дефекты прокоагулянтной активности тромбоцитов (патология 3-го тромбоцитарного фактора)
- 2.1.4. Дефекты созревания тромбоцитов (синдром Мея-Хеглина, синдром Фехтнера, Монреальский синдром)

2.2. Приобретенные:

- 2.2.1. при заболеваниях и синдромах (синдром ДВС, пороки сердца, уремия, парапротеинемия, иммунные и аллергические заболевания, нефропатии, мегалобластная анемия, гипотироз, гипоэстрогения, лучевая болезнь, опухоли и др.)
- 2.2.2. при воздействии лекарственных препаратов (нестероидные противовоспалительные, дезагреганты, карбенициллин, β -лактамы и др.)

3. Коагулопатии

- 3.1. *Наследственные и врожденные* (наследственный дефицит плазменных факторов свертывания крови, первичный наследственный гиперфибринолиз)
- 3.2. *Приобретенные* (дефицит К-витамин зависимых факторов свертывания, иммунокоагулопатии, паропротеинемические и дисглобулинемические коагулопатии, влияние антикоагулянтов, активация фибринолиза, изолированный приобретенный дефицит отдельных факторов свертывания (системный амилоидоз, нефротический синдром, интоксикации организма, инфекционные болезни и др.), комбинированная коагулопатия при гемобластозах, болезнях печени, почек, сердца и др.)

4. Вазопатии

- 4.1. *Наследственные и врожденные* (геморрагическая телеангиэктазия, гемангиомы, наследственный тромбоцитопенический микроангиоматоз, атаксия-телеангиэктазия, ангиоматоз сетчатки и др.)
- 4.2. *Приобретенные* (геморрагический васкулит, вазопатии аллергического, инфекционного, интоксикационного, нейрогенного, эндокринного генеза и др.)

II. ТРОМБОФИЛИЧЕСКИЕ ГЕМОСТАЗИОПАТИИ

1. *Наследственные и врожденные* (дефицит и/или дисфункция естественных антикоагулянтов, плазминогена, усиление биосинтеза или замедление катаболизма ингибиторов плазмина, дефицит эндогенных активаторов плазминогена, нарушение синтеза и/или высвобождения простациклина эндотелием и др.)
2. *Приобретенные* (локальные и системные венозные или артериальные вазопатии, парапротеинемическая тромбофилия, тромбоцитемии, полиглобулическая тромбофилия и др.)

III. ТРОМБОГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И СИНДРОМЫ

Приобретенные (синдром ДВС, васкулиты, диссеминированная активация тромбоцитов (атеросклероз, ИБС, гипертоническая болезнь, иммунные и

аллергические реакции и др.), трансфузии несовместимой по групповой (ABO) и Rh-принадлежности крови и др.

3.2. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ГЕМОСТАЗИОЛОГИИ

Известно, что мутации генов VIII, IX и XI факторов свертываемости крови приводят к развитию гемофилий А, В и С. Нарушения работы генов VIII и IX факторов передаются по рецессивному, связанному с полом типу наследования, так как эти гены расположены в половой X хромосоме (при этом болеют мужчины, женщины являются носительницами гена гемофилии). Болезнь Виллебранда возникает при нарушениях структуры гена vWD, кодирующего фактор Виллебранда, который так же является одним из важных компонентов системы свертываемости крови. Болезнь фон Виллебранда и гемофилия С – это заболевания с аутосомным, не связанным с полом типом наследования. При болезни Виллебранда различают тяжелую и умеренную форму заболевания, которые зависят от того, в каких участках гена vWD возникает мутация. Обычно тяжелые формы болезни Виллебранда развиваются при мутациях, приводящих к аминокислотным заменам в домене, отвечающим за образование функционально активного комплекса из четырех молекул этого белка. При данных заболеваниях известно множество мутаций, которые часто оказываются уникальными для конкретного пациента, поэтому при проведении молекулярно-генетической диагностики часто прибегают к косвенным методам, основанным на изучении родословной семьи путем сопоставления наследования признака заболевания с анализом распределения среди членов семьи полиморфных маркеров. При гемофилии А также определяют встречающиеся у половины всех больных повторяющиеся инверсии, нарушающие работу гена VIII фактора свертываемости крови. При гемофилии В поиск истинных мутаций упрощен относительно небольшими размерами гена, кодирующего IX фактор свертываемости крови. При мутационном анализе болезни Виллебранда особое внимание уделяют тем дефектам гена vWD, которые приводят к тяжелым формам этого заболевания. При проведе-

нии косвенного анализа носительства дефектного гена при этом заболевании используют три STR-полиморфизма из 40 интрона гена *vWD*.

Мутации ряда генов приводят к тромбофилии, т.е. к увеличению свертывающей активности крови. На сегодняшний день тромбофилия различной природы характеризуется широкой распространенностью, трудностью диагностики и высоким процентом смертности. В развитых странах на тромбофилию приходится 1/3 всех внезапных смертей. Тяжелыми последствиями тромбофилии являются такие тромботические осложнения, как инфаркт миокарда, инсульт, образование трофических язв и бесплодие. По данным многочисленных исследований за последние годы это заболевание вышло на 1-е место среди причин материнской смертности. Кроме того, одним из самых опасных венозного тромбоза может стать тромбоэмболия лёгочной артерии. Тромбофилия, являясь мультифакторным заболеванием, зависит как от факторов внешней среды, так и от наследственных (генетических) факторов. При повышенном генетическом риске развития тромбозов даже умеренное воздействие неблагоприятных факторов внешней среды может стать причиной развития тяжелых осложнений. Наиболее изученным фактором развития наследственной тромбофилии является однонуклеотидная замена *+1691G/A* в гене *F5* (мутация Leiden). Этот ген кодирует V фактор коагуляции, негативную регуляцию которого осуществляет активированный протеин C. Полиморфизм *+1691G/A* в гене *F5* придает устойчивость активной форме фактора V к расщепляющему действию белка C, что приводит к накоплению фибрина и может стать причиной образования тромба.

Второй по значимости генетический дефект, увеличивающий предрасположенность к развитию тромбозов и инфаркту миокарда, - частая мутация II фактора свертывания крови или протромбина (точечная мутация *G20210A*). В ходе ферментативного расщепления протромбина образуется тромбин, катализирующий превращение фибриногена в фибрин, полимеры которого являются основной составляющей тромба. Полиморфизм *+20210G/A* гена *F2* и усиливает экспрессию этого гена, что в свою очередь

приводит к увеличению концентрации протромбина в крови и активному образованию тромбов.

Кроме того, артериальные и венозные тромбозы часто ассоциированы с гиперцистеинемией. Наиболее изученным полиморфизмом, влияющим на уровень гомоцистеина в крови является полиморфизм +677C/T в гене *MTHFR*, кодирующем фермент метилентетрагидрофолатредуктазу. При недостаточной активности метилентетрагидрофолатредуктазы замедляется реакция превращения гомоцистеина в метионин, повышается уровень гомоцистеина, что приводит к воспалению эндотелиальной выстилки сосудов и тромбозам.

Обнаружена предрасположенность к инфаркту миокарда у лиц, имеющих точечную мутацию в VII факторе свертываемости крови, ведущей к аминокислотной замене R353Q. Молекулярную диагностику этих генетических дефектов можно проводить при помощи прямого секвенирования ПЦР-продуктов, но чаще используют ПДРФ-анализ, так как эти точечные мутации нарушают сайты, узнаваемые рестриктазами.

Определение полиморфизма генов *F5*, *F2* и *MTHFR* позволит выявлять людей с генетической предрасположенностью к тромбофилии, прогнозировать возможность ее развития и своевременно осуществлять целенаправленную профилактику. Кроме того, такая идентификация позволяет определить генетический дефект, ставший причиной уже существующей тромбофилии, что дает возможность корректировать тактику ведения пациента с учетом его индивидуальных особенностей.

3.2. ТРОМБОЦИТОПЕНИИ

Тромбоцитопении - заболевания из группы геморрагических диатезов, обусловленные снижением количества тромбоцитов в периферической крови. В структуре геморрагических диатезов тромбоцитопении у детей занимает первое место при среднем уровне заболеваемости 25 на 1000 детского

населения. К основным причинам приобретенных тромбоцитопений можно отнести:

- нарушение продукции тромбоцитов в КМ в результате воздействия химических веществ, медикаментов, ионизирующего облучения, как проявление заболеваний – гемобластозы, лейкемизация опухолей, апластические анемии, мегалобластные анемии, ВИЧ – инфекция и др.

- повышенное разрушение тромбоцитов в крови в результате действия антител, медикаментов, инфекционных агентов (EBV, HSV, CMV, парвовирус В19, бактерии и грибки), вакцин, вследствие укусов насекомых, гиперинсоляции, механического разрушения, гиперспленизма.

Все приобретенные тромбоцитопении, за исключением иммунных, являются симптоматическими и не имеют специфической терапии, лечение проводится по программе основного заболевания.

Иммунная тромбоцитопения (ИТ) является заболеванием из группы геморрагических диатезов, характеризующихся снижением количества тромбоцитов в крови в результате повышенного их разрушения под воздействием различных антитромбоцитарных антител при нормальном или повышенном содержании мегакариоцитов в КМ. В зависимости от вида ИТ классифицируется на типы: трансиммунная, изоиммунная (аллоиммунная), гетероиммунная, аутоиммунная. В результате повреждающего действия антитромбоцитарных антител срок жизни тромбоцитов резко сокращается, появляется их дефицит в крови, компенсаторно усиливается тромбоцитопоез, приводящий к увеличению популяции макротромбоцитов. При этом глубина тромбоцитопении определяется числом разрушающихся в единицу времени тромбоцитов и возможностями КМ компенсировать дефицит тромбоцитов в циркуляции. Дефицит тромбоцитов приводит к метаболическим нарушениям эндотелия сосудов, сопровождающимся повышением сосудистой проницаемости и появлением спонтанных геморрагий.

Трансиммунный механизм тромбоцитопении возможен у плода и новорожденного при проникновении через плаценту аутоантител матери, имев-

шей когда-либо ИТ или другое аутоиммунное заболевание. Риск развития трансиммунной тромбоцитопении у новорожденного при хронической форме ИТ у беременных составляет 30-75 %, причем число тромбоцитов у них может быть нормальным в течение нескольких лет после проведенной консервативной терапии или спленэктомии. Антитромбоцитарные АТ при данном варианте направлены к гликопротеинам мембраны тромбоцитов gpIb/IXb, при этом тромбоцитопения у ребенка транзиторная, нормализация количества тромбоцитов происходит к концу 4-12 нед.

Аллоиммунный механизм предполагает конфликт по тромбоцитарным антигенам между разными людьми. Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения может развиваться при первой же беременности вследствие иммунного конфликта между матерью и плодом. Антитела синтезируются в результате иммунизации матери аллогенными детерминантами тромбоцитов плода, полученными от отца и отсутствующими на материнских тромбоцитах. Основной причиной продукции аллоантител является несовместимость родителей по антигену НРА (Human Platelet Alloantigen), который представлен двумя аллельными формами: НРА Ia и НРА Ib, отличающимися заменой лейцина на пролин в 33 положении молекулы gpIIIa. Иммунизация матери, гомозиготной по более редкому аллоантигену НРА Ib, происходит аллоантигеном НРА Ia, присутствующим на тромбоцитах отца и ребенка. Риск аллоиммунизации по данному механизму ассоциирован с наличием у матери антигена гистосовместимости HLA-DR3 (w52a). Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения так же может развиваться в результате продукции антител против неизмененных антигенов плода gpIIb/IIIa, gpIb/IX/V и gpIV у женщин с тромбастенией Гланцмана, синдромом Бернара-Сулье и дефицитом gpIV. Циркуляция антитромбоцитарных аллоантител у новорожденных сохраняется в течение 2-3 недель, затем они элиминируются.

Посттрансфузионная тромбоцитопения развивается в результате продукции перекрестно-реагирующих аллоантител через несколько часов после переливания плазмосодержащих компонентов крови и обусловлена трансфу-

зией антител, взаимодействующих с НРА1 антигенами тромбоцитов (анти-Zw аллоантитела), крайне редко к НРА-5b антигену (анти-Br аллоантитела). Средняя продолжительность тромбоцитопении после переливания таких компонентов крови 7 -12 дней. Данный вариант ИТ у детей встречается очень редко.

Гетероиммунный механизм разрушения тромбоцита провоцируется антигенами (вирусы, бактерии, медикаменты, вакцины и т.п.) и возникает в результате изменения антигенной структуры тромбоцитов. Патогенез, как правило, обусловлен двумя механизмами: гаптен связывается с мембраной тромбоцита, повреждает ее и вызывает иммунный ответ или гаптен, связываясь с белками плазмы, образует неоантиген к которому вырабатываются антитела. В первом случае антитела направлены против комплекса тромбоцит-гаптен. Во втором случае комплекс антитело-неоантиген фиксируется на мембране тромбоцитов, что приводит их к лизису или фагоцитозу клетками моноцитарно-макрофагальной системы. Тромбоциты в данной ситуации выступают в роли «невинных» свидетелей иммунного конфликта. Наиболее типичным примером гетероиммунной тромбоцитопении является лекарственно индуцированная. В настоящее время известно около 50 лекарственных препаратов, прием которых может привести к возникновению тромбоцитопении. Среди них анальгетики, сульфаниламиды, антибиотики (котримоксазол, ампициллин, цефалоспорины, ванкомицин, карбамазепин, циметидин, рифампицин), нитрофураны, нестероидные противовоспалительные средства, антидиабетические, седативные, транквилизаторы, противосудорожные, диуретики (фуросемид, ацетазоламид, хлортиазид), гепарин, хинин, хинидин, дипиридамол, дигитоксин, парацетамол, β-блокаторы, тиазиды, соли золота. Развиваются гаптеносвязывающие тромбоцитопении остро (через 2-3 суток после приема медикамента или на фоне вирусной инфекции). В связи с тем, что антиген чаще всего элиминируется из организма, острая гетероиммунная тромбоцитопения является самоограниченным заболеванием, которое может проходить спонтанно или трансформироваться в аутоиммунную тромбоцитопению.

нию. При кратковременном характере гетероиммунная тромбоцитопения заканчивается самопроизвольным стойким выздоровлением через 4-6 месяцев, что связано, в первую очередь, с прекращением антителообразования.

Аутоиммунный механизм предполагает выработку антител, направленных против собственных тромбоцитов, которые становятся антигенами в результате присутствия на их мембране Ig G, компонентов системы комплемента, Fc-фрагмента Ig, комплекса ГП IIb-IIIa. При аутоиммунной тромбоцитопении срыв иммунологической толерантности приводит к синтезу В-лимфоцитами антител направленных против собственных неизменных антигенов мембраны Tr - gpIIb/IIIa и Ib/IXV. В большинстве случаев антитела при аутоиммунной тромбоцитопении относятся к классу IgG₁₋₃, однако, при остром течении заболевания, индуцированном вирусной инфекцией, у 62% детей определяются тромбоцит-ассоциированные IgM-аутоантитела. К срыву иммунологической толерантности могут привести следующие триггерные факторы: вирусные и (реже) бактериальные инфекции, профпрививки, психические и физические травмы, переохлаждение, интоксикация, аллергические и шоковые состояния, прием медикаментов и др.

Аутоиммунная тромбоцитопения может быть первичной и вторичной в зависимости от фона возникновения. Первичная аутоиммунная тромбоцитопения развивается сразу же как самостоятельное заболевание. Патогенез вторичной аутоиммунной тромбоцитопении связан с выработкой антитромбоцитарных аутоантител. Однако вторичная аутоиммунная тромбоцитопения развивается не самостоятельно, а на фоне какого-либо основного заболевания, которому свойственно осложняться аутоиммунной цитопенией. К таким заболеваниям относятся ряд гемобластозов (неходжкинские лимфомы, лимфогранулематоз, макроглобулинемия Вальденстрема), синдром Фишера-Эванса, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, хронический активный гепатит, тиреоидит. Антитромбоцитарные аутоантитела представлены IgG и направлены против гликопротеинов тромбоцитарной мембраны.

Клиническая картина ИТ характеризуется петехиально-пятнистым типом кровоточивости. Геморрагические высыпания и экхимозы локализуются диффузно генерализованно на коже и слизистых, кровотечения из мелких поверхностно расположенных сосудов слизистых оболочек (носовые, десневые), желудочно-кишечные, почечные, маточные, возможны кровоизлияния в органы и ткани (мозг, сетчатка глаза, среднее ухо и т.п.). Выраженность геморрагического синдрома переменна и зависит от степени тромбоцитопении: кровоточивость возможна при снижении количества тромбоцитов менее $50 \cdot 10^9/\text{л}$, угроза серьезных кровотечений возникает при тромбоцитопении менее $30 \cdot 10^9/\text{л}$. Симптомы кровоточивости при ИТ классифицируют на четыре группы: без симптомов, слабые, умеренные и выраженные (таблица 18). Клинические проявления и течение болезни у детей и взрослых различаются. У детей, как правило, наблюдается острое течение заболевания с тенденцией к самопроизвольному спонтанному разрешению. Для взрослых характерно хроническое течение ИТ с постепенным началом. У одной трети взрослых больных отмечается вялотекущая форма тромбоцитопении с относительной устойчивостью к большинству методов лечения. Только у 5% взрослых больных с хронической ИТ ремиссия наступает спонтанно.

Таблица 18 - Характеристика симптомов кровоточивости при ИТ у детей

<i>Выраженность симптома</i>	<i>Характеристика</i>
Слабой степени	Единичные экхимозы и петехии, редкие эпизоды кровоточивости со слизистой носа
Умеренной степени	Множественные кожные проявления, энантемы на слизистой полости рта, носовые кровотечения
Выраженные	Распространенная геморрагическая сыпь на коже и слизистых, упорные кровотечения (носовые, почечные, мелена, меноррагии)

Классификация ИТ основывается на определении формы, течения и периода (таблица 19).

Таблица 19 - Классификация ИТ у детей

ФОРМЫ	ТЕЧЕНИЕ	ПЕРИОДЫ
<ul style="list-style-type: none">• Сухая• Влажная	<ul style="list-style-type: none">• Острое• Хроническое<ul style="list-style-type: none">- редко рецидивирующее- часто рецидивирующее- непрерывно рецидивирующее	<ul style="list-style-type: none">• Обострение• Клиническая ремиссия• Клинико–гематологическая ремиссия

Сухая форма ИТ проявляется геморрагическим синдромом только в виде сыпи на коже и слизистых; влажная форма предполагает наличие кровотечений, кровоизлияний в органы и ткани. Острое течение ИТ ограничивается временным промежутком 6 месяцев, хроническое – свыше 6 месяцев. При хроническом редко рецидивирующем течении частота обострений 1-3 раза в год, при часто рецидивирующем - более 3-х раз в год, при непрерывно рецидивирующем – ежемесячно. Периодом обострения считается наличие клинических проявлений геморрагического синдрома и/или снижение числа тромбоцитов менее $30 \cdot 10^9/\text{л}$. Клиническая ремиссия характеризуется отсутствием геморрагического синдрома, клинико–гематологическая ремиссия – отсутствием геморрагического синдрома и нормальным количеством тромбоцитов в периферической крови.

Диагностика ИТ складывается из данных клинического осмотра (выявление геморрагического синдрома петехиально-пятнистого типа кровоточивости) и лабораторно-инструментальных методов обследования:

- общий анализ крови (изолированное снижение числа тромбоцитов или их отсутствие, макроформы тромбоцитов, возможна гипохромная анемия различной степени тяжести в зависимости от степени выраженности геморрагического синдрома);
- миелограмма (нормальное или повышенное количество активно функционирующих мегакариоцитов в КМ, присутствие молодых мегакариоцитов с

базофильной и азурофильной зернистостью, при постгеморрагической анемии - гиперплазия эритроидного ростка кроветворения);

- исключение других форм тромбоцитопении (наследственных, симптоматических) - отсутствие клинических признаков системных и онкогематологических заболеваний, отсутствие сниженного количества и низкой функциональной активности мегакариоцитов и т.п.

Комплексное лечение при всех формах ИТ: купирование геморрагического синдрома, выявление и лечение сопутствующих заболеваний, специфическую терапию (влияние на модуляцию иммунного ответа). У всех пациентов с ИТ целью терапии и/или наблюдения является профилактика кровотечений (внутричерепного кровоизлияния или кровотечения из слизистых с развитием тяжелой постгеморрагической анемии), угрожающих жизни больного, в течение периода тромбоцитопении. Если любое из этих осложнений присутствует, то терапия показана немедленно, вне зависимости от количества тромбоцитов в крови. Так как у детей чаще наблюдается острая ИТ, и возможно спонтанное выздоровление, при отсутствии кровотечений целесообразно наблюдение за больным. Если кожный геморрагический синдром не нарастает, то специфическая терапия не показана. Как правило, в такой ситуации геморрагии на коже исчезают в течение 7-10 дней, количество тромбоцитов Tg нормализуется за 3 – 8 недель индивидуально у каждого пациента. Длительность тромбоцитопении определяется временем циркуляции в крови антитромбоцитарных антител - от 3 недель до 6 месяцев.

Тактика ведения пациентов при острой ИТ:

- при количестве тромбоцитов более $30 \cdot 10^9/l$ и отсутствии геморрагического синдрома специфическая терапия не назначается, рекомендуется амбулаторное наблюдение, режим, диета, прием ангиопротекторов;
- при количестве тромбоцитов менее $30 \cdot 10^9/l$, а у детей младше 3 лет менее $20 \cdot 10^9/l$ и геморрагиях на коже и слизистых оболочках – госпитализация и назначение патогенетической специфической терапии;
- вне зависимости от количества тромбоцитов, при наличии у ребенка

тяжелых, угрожающих жизни кровотечениях - госпитализация и назначение патогенетической специфической и антигеморрагической терапии.

В случае принятия решения наблюдения за пациентом без назначения специфического лечения, у всех больных должны быть исключены нестероидные противовоспалительные средства, антиагреганты и антикоагулянты. Не следует делать внутримышечные инъекции. Исключаются вакцинации и аллергены (в том числе пищевые), так как они могут увеличить степень тромбоцитопении. Ребенку с выраженным геморрагическим синдромом и/или количеством тромбоцитов менее $50 \cdot 10^9/\text{л}$ следует резко ограничить двигательный режим, игры на улице. Занятия спортом противопоказаны при количестве тромбоцитов менее $100 \cdot 10^9/\text{л}$.

Предугадать острое или хроническое течение ИТ невозможно. Но можно выделить факторы, способствующие хронизации процесса: неадекватная терапия глюкокортикостероидами (начальная доза менее 2 мг/кг в сутки, длительность курса в полной дозе менее 3 недель); трансфузии тромбомассы или тромбоконцентрата; вирусная персистенция; хронические очаги инфекции; пубертатный период; социально-бытовые факторы, определяющие напряженный эмоциональный статус пациента.

Базовое лечение ИТ складывается из двух основных направлений: патогенетической (специфической) и симптоматической терапии. Патогенетическая терапия ИТ, в свою очередь, делится на базисную и альтернативную. Учитывая, что в основе патогенеза ИТ лежит аутоиммунный процесс, основными направлениями специфической терапии являются: уменьшение продукции аутоантител; нарушение связывания аутоантител с тромбоцитами, устранение деструкции сенсibilизированных антителами тромбоцитов клетками моноцитарно-макрофагальной системы. На сегодняшний день во всем мире базисными методами специфической терапии ИТ являются: ГКС и внутривенный иммуноглобулин. Для оценки эффективности проводимой терапии условно определены критерии гематологического ответа:

- полный гематологический ответ - количество тромбоцитов более $150 \cdot 10^9/\text{л}$;

- частичный гематологический ответ - количество тромбоцитов более $50 \cdot 10^9/\text{л}$ или увеличение количества тромбоцитов более чем на $15 \cdot 10^9/\text{л}$ при отсутствии геморрагического синдрома (у больных с тромбоцитопенией менее $20 \cdot 10^9/\text{л}$ до начала терапии);
- отсутствие ответа на терапию - увеличение количества тромбоцитов менее чем на $15 \cdot 10^9/\text{л}$ при сохранении геморрагического синдрома.

Внутривенный иммуноглобулин (ВВИГ) - препарат нормального полиспецифического иммуноглобулина G (минимум 90%), полученного из пула плазмы минимум 1000 здоровых доноров. Механизмы его действия заключаются в блокаде Fc-рецепторов макрофагальных клеток, ингибировании синтеза аутоантител В-лимфоцитами, усилении функции Т-супрессорных клеток, угнетении действия комплемента, защите тромбоцитов и мегакариоцитов от антител, терапии персистирующих вирусных инфекций. Прежде всего, терапия ВВИГ рекомендуется при остром течении ИТ, поскольку дает быстрый (24 - 48 часов) гематологический ответ. Абсолютными показаниями к терапии ВВИГ первой линии являются: возраст пациента до 4-х лет, развитие ИТ после вакцинации, аллергии, на фоне вирусной инфекции, неонатальные иммунные тромбоцитопении с выраженным геморрагическим синдромом. При остром течении ИТ суточная доза ВВИГ составляет 400мг/кг, курс – от 3 до 5 дней. При хроническом течении ИТ препарат вводится в дозе 1г/кг в сутки в течение 1 – 2 дней, затем поддерживающие инфузии в дозе 0,5 - 1 г/кг в сутки 1 раз в 2 – 4 недели в зависимости от ответа для поддержания количества тромбоцитов не менее $50 \cdot 10^9/\text{л}$.

Применение ГКС в лечении ИТ также является основным методом базисной специфической терапии, так как они воздействуют на все основные звенья патогенеза ИТ способствуют снижению деструкции тромбоцитов, ингибируют фагоцитоз, угнетают выработку и нарушают взаимодействия антиел с гликопротеинами мембраны тромбоцитов. Прямыми показаниями к назначению ГКС при ИТ являются: распространенный кожный синдром при количестве тромбоцитов менее $20 \cdot 10^9/\text{л}$; влажная форма ИТ при количестве

тромбоцитов менее $50 \cdot 10^9$ /л; кровоизлияния, кровотечения. Рекомендуется воздержаться от назначения ГКС при сухой форме ИТ и количестве тромбоцитов более $30 \cdot 10^9$ /л. Существуют различные схемы кортикостероидной терапии ИТ (таблица 20). Однако предпочтение отдается пульс-терапии ГКС.

Таблица 20 - Схемы кортикостероидной терапии при ИТ

Глюкокортико- костероиды	Доза
Преднизолон внутри	<ul style="list-style-type: none"> - стандартные дозы - 2мг/кг·сут (максимум 60мг/м² в сут) в течение 21 дня с медленной отменой по 2,5мг в 2-3 дня под контролем уровня Тг (общая продолжительность курса не более 1,5-2 мес) - прерывистая терапия стандартными дозами - 2мг/кг·сутки в течение 5-7 дней с пятидневным перерывом (от 3 до 5 курсов)
Метилпредни- золон внутри или в/венно	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Solu-medrol</i> 30 мг/кг·сут (максимально допустимая доза 2 гр) 3 дня в/в, курс повторить через 7 - 10 дней - пульс-терапия - 3-5мг/кг·сут (максимальная доза 180 мг/сут) в течение 4 дней ежемесячно, 6 курсов - 4 мг/кг·сут в течение 7 дней с постепенной полной отменой к 21 дню - 4-8 мг/кг·сут в течение 7 дней с быстрой отменой, 2-3 курса с интервалом 1 неделю - 10 - 30 мг/кг·сут внутри в течение 3-7 дней с быстрой отменой, курс можно повторить через 7-10 дней (всего 2-3 курса) - 10 – 30 мг/кг·сут (или 500мг/м²·сут) в/в за 30 мин в течение 3-7 дней ежемесячно, 6 курсов (рекомендуется при хроническом течении)
Дексаметазон внутри	<ul style="list-style-type: none"> - 0,5 мг/кг·сут (максимально 40 мг/сут) по 4 дня каждые 28 дней, всего - 6 курсов

Применение препаратов базисной специфической терапии ИТ не всегда может обеспечить высокую эффективность. Так, при лечении ГКС ковременный ответ составляет в среднем 66 %, а долгосрочный - только лишь 16 %. Внутривенный иммуноглобулин обеспечивают нормализацию количества тромбоцитов в 75 % случаев. В связи с этим при ИТ используется альтернативная специфическая терапия, которая применяется индивидуально в зависимости от течения и степени выраженности заболевания при неэффективно-

сти стандартных методов терапии. Этот терапевтический подход предполагает использование интерферона альфа, иммунных препаратов, спленэктомии и рентгенэндоваскулярной окклюзии селезенки.

Препараты Интерферона – альфа являются высоко очищенным белком, обладающий многими свойствами эндогенного интерферона человека: активирует Т-лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, естественные киллерные клетки, стимулируя синтез IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , оказывает противовирусное и антипролиферативное действие. Механизмы действия интерферона-альфа (IFN- α), способствующие снижению гибели тромбоцитов при ИТ, заключаются в ингибировании продукции Ig В-клетками, элиминации антигенов (чаще вирусных), играющих ключевую роль в формировании хронического процесса и определении прогноза заболевания, индукции экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II класса на клетках-мишенях, что приводит к усилению распознавания этих клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами, ингибировании пролиферации антигенстимулированных Т-клеток и клеточного ответа на IL-4. Назначается интерферон 3 млн.МЕ/м² в сутки подкожно или внутримышечно 3 раза в неделю, длительность лечения зависит от полученного терапевтического эффекта. Средняя скорость гематологического ответа (интервал от начала терапии до достижения максимального числа Тг) составляет 15 дней с колебаниями от 7 до 39 дней. Таким образом, минимальная длительность курса должна быть не менее 1 месяца. При отсутствии терапевтического ответа через 1,5 месяца лечение прекращается. Длительность терапии IFN- α зависит от эффективности терапии и типа гематологического ответа. Полный гематологический ответ определяется достижением количества тромбоцитов более $150 \cdot 10^9$ /л. Частичный гематологический ответ предполагает увеличение количества тромбоцитов в 2 и более раза по сравнению с исходным, более $30 \cdot 10^9$ /л, но менее $150 \cdot 10^9$ /л. В современной гематологии при хронических формах ИТ успешно применяется терапия малыми дозами IFN- α - 500 000 МЕ в сутки 3 раза в неделю в течение 12-16 недель в зависимости от ответа с переходом на поддер-

живающую терапию 500 000 МЕ в сутки 1 раз в неделю длительно (6-18 месяцев).

Эффективность применения для терапии хронических рефрактерных ИТ продемонстрировал препарат на основе моноклональных антител к CD20 (Ритуксимаб) - химерическое моноклональное антитело человека и мыши, которое специфически связывается с трансмембранным антигеном CD20. Ритуксимаб инициирует иммунологические реакции, опосредующие лизис В-клеток. Выбор CD20 молекулы в качестве мишени для моноклональных антител связан с особенностями дифференцировки В-лимфоцитов, в процессе которой клетки экспрессируют определенные мембранные молекулы. Экспрессия CD20 есть на мембране «ранних» и зрелых В-лимфоцитов, и отсутствует у пре-В, дендритных и плазматических клеток. Поэтому их истощение не препятствует регенерации пула В-лимфоцитов и не влияет на синтез иммуноглобулинов плазматическими клетками. Кроме того, CD20 не высвобождается с мембраны В-лимфоцитов в кровяное русло и поэтому не блокирует взаимодействие ритуксимаба с В-клетками, что увеличивает эффективность терапии. Возможные механизмы В-клеточной элиминации включают комплемент зависимую и антителозависимую цитотоксичность, а также индукцию апоптоза. Медиана числа В-клеток в периферической крови после 1-го введения препарата снижается до уровня ниже нормы, а через 6 месяцев начинает восстанавливаться, возвращаясь к норме между 9 и 12 месяцами после завершения терапии, что и позволяет эффективно применять ритуксимаб в терапии многих аутоиммунных заболеваний, в том числе аутоиммунных цитопений. Известно, что истощение В-клеток оказывает существенное влияние на основные механизмы развития аутоиммунных заболеваний. Ослабление антиген - презентующей функции В-клеток в отношении индукции пролиферации и синтеза цитокинов CD4+ Т-клетками, снижение образования аутоантиген - специфичных В-клеток памяти вследствие деструкции aberrantных ростковых центров приводят к угнетению синтеза антител. Снижение экспрессии CD40 и CD80 на В-лимфоцитах тормозит активацию

Т-клеток. Кроме того, происходит индукция элиминации аутореактивных Т-лимфоцитов и восстановление аутоотолерантности. Стандартный курс терапии ритуксимабом заключается в 4 еженедельных введениях препарата в дозе 375 мг/м². Средняя продолжительность периода времени до получения ответа на терапию составляет 5,5 недель от первого введения. Критериями эффективности являются клинические данные и лабораторные параметры. Общим при всех заболеваниях лабораторным параметром является определение уровня CD20+ в крови пациента. Доказана эффективность малых доз ритуксимаба при лечении рефрактерной ИТ. Фиксированная доза 100 мг 1 раз в неделю в течение 4-х недель позволяет получить терапевтический ответ у 75% больных, из которых у 2/3 сохраняется долгосрочный эффект. Благоприятными прогностическими параметрами стойкого терапевтического эффекта ритуксимаба служат молодой возраст пациента, короткий интервал от момента диагностики ИТ до начала терапии и минимальное количество предшествующих других режимов лечения.

Детям с тяжелым течением персистирующей острой (длительность заболевания 3-12 месяцев) или хронической ИТ (длительность заболевания более 12 месяцев), плохо поддающейся стандартной терапии, необходимы лекарственные средства с минимальной токсичностью для длительного поддерживающего лечения с целью улучшения качества жизни и обеспечения социальной адаптации. В настоящее время альтернативой терапией является назначение агонистов тромбopoэтиновых рецепторов – препаратов ромиплостим и элтромбопаг, одобренных FDA (Федеральное агентство по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов, США) после проведения крупных рандомизированных клинических исследований с наличием контрольных групп. Ромиплостим относится к тромбopoэтиновым миметикам и является пептидным антителом, активирующим внутриклеточный транскрипционный путь посредством c-Mpl-рецепторов. Гибридная молекула ромиплостима состоит из Fc-домена человеческого иммуноглобулина IgG1, в которой каждая одноцепочечная субъединица связана ковалентной

связью в С-конце с пептидной цепью, содержащей два фрагмента, связывающих тромбopoэтиновый рецептор. Ромиплостим не содержит последовательностей аминокислот, гомологичных эндогенному тромбopoэтину, что снижает вероятность возникновения тромбоцитопении у пациентов за счет возможной выработки нейтрализующих антител к ромиплостиму.

Ромиплостим может использоваться для длительной поддерживающей терапии детей с непрерывно рецидивирующим течением ИТ, резистентных к терапии ГКС, с достижением гематологического ответа в 87,5% случаев. Препарат хорошо переносится пациентами, не вызывает токсичности, значительно улучшает качество жизни и помогает социальной адаптации. Использование стартовой дозы препарата 3 мкг/кг с последующим еженедельным повышением на 1-2 мкг/кг в неделю у пациентов, резистентных к терапии ГКС, позволяет получить более быстрое купирование геморрагического синдрома и способствует достижению гематологического ответа. Терапия ромиплостимом в течение 6 месяцев и более значительно эффективнее 4-х недельного курса, так как связана с формированием иммунологической толерантности. Побочные эффекты на фоне терапии ромиплостимом отмечаются у 45-47% пациентов, являются легко контролируемыми и регрессируют на фоне симптоматической терапии.

Спленэктомия при хронической ИТ приводит к стойкой клинико-гематологической ремиссии в 60 - 70 % случаев. Эффективность этого метода терапии объясняется тем, что селезенка является органом продукции антител и приоритетным местом гибели тромбоцитов. Хорошим прогностическим фактором является повышение количества тромбоцитов более $400-600 \cdot 10^9/\text{л}$ через несколько дней после операции, а также отсутствие тромбоцит-ассоциированных IgG. Вопрос о проведении спленэктомии решается индивидуально для каждого случая. Показаниями к проведению спленэктомии у детей с ИТ являются:

- длительность заболевания менее 12 месяцев, число тромбоцитов менее $10 \cdot 10^9/\text{л}$, наличие кровотечений и отсутствие эффекта от консервативной терапии
- длительность заболевания более 12 месяцев и число тромбоцитов менее $30 \cdot 10^9/\text{л}$, тяжелый геморрагический синдром и отсутствие эффекта от консервативной терапии
- хроническое течение с геморрагическим синдромом и постоянным уровнем Тг менее $30 \cdot 10^9/\text{л}$ при отсутствии ответа на консервативную терапию в течение нескольких лет.
- явления гиперспленизма
- в случае определения селезенки основным местом разрушения тромбоцитов.

Спленэктомия практически не проводится в течение 2-х лет после постановки диагноза, так как острая ИТ может контролироваться консервативной специфической терапией (базисной и альтернативной). Факторами риска спленэктомии являются технические сложности во время операции и в послеоперационном периоде, а также инфекционно-септические осложнения (20 %). Оперативная летальность составляет 3-12 %. Лучшим методом удаления селезенки, «золотым стандартом», при ИТ считается лапароскопическая спленэктомия. Лапароскопическая спленэктомия является технически сложной операцией, но при этом уровень операционной смертности составляет 0,9%, а послеоперационных осложнений – 12 %. Причинами могут быть внутриоперационные кровотечения, спаечный процесс, выраженная спленомегалия и ожирение. Наиболее частыми осложнениями во время операции являются: повреждение плевры, диафрагмы, ранение поджелудочной железы.

Удаление селезенки может сопровождаться развитием осложнений, связанных с дефектом иммунного ответа или синдромом гипоспленизма, проявляющегося в понижении жизненного тонуса, явлениях психической лабильности и снижении трудоспособности. Риск смерти от сепсиса после спленэктомии достигает 0,7 %. После спленэктомии повышается восприим-

чивость к паразитарным, грибковым и вирусным инфекциям. Селезенка является единственным источником тафтсина, одной из фракций Ig, который влияет на фагоцитарную активность нейтрофилов и регулирует деятельность Т- и В-лимфоцитов. Дефицит тафтсина вызывает повышенную восприимчивость к различным инфекциям, особенно к пневмококковой и менингококковой, которые развиваются по типу молниеносного сепсиса с ДВС. В связи с этим при подготовке к спленэктомии должна проводиться профилактика инфекций: за 2 недели до плановой операции (в экстренных случаях – через 2 недели после операции) вакцинация пневмококковой (Pneumovax), менингококковой групп А, С, Y, W (Mencevax ACYW) и Haemophilus influenza (группы Hib) вакцинами в виде одноразовой инъекции 0,5 мл п/к или в/м, ревакцинация каждые 5 лет, профилактический прием антибиотиков per os (феноксиметилпенициллин детям до 5 лет 250 мг/сут, 5-12 лет – 500 мг/сут, старше 12 лет – 1000 мг/сут в 2 приема) или парентерально (бициллин-1 в/м 1 раз в 3 недели детям старше 12 лет – 2,4 млн. ЕД, детям до 12 лет в зависимости от веса: до 25 кг – 600 тыс. ЕД, более 25 кг – 1,2 млн. ЕД) в течение 2 лет

Кроме того, подготовка к спленэктомии включает введение ГКС или ВВИГ. Количество тромбоцитов на момент операции должен быть не ниже $90 \cdot 10^9/\text{л}$. В тяжелых случаях, при количестве тромбоцитов менее $10 \cdot 10^9/\text{л}$ перед проведением операции осуществляется введение рекомбинантного активированного фактора свертывания VII (Novoseven) в дозе 50 – 90 мкг/кг каждые 2 часа в предоперационный период и последующие 36 часов. Применение НовоСэвен (Novoseven) при рецидивирующих, резистентных к специфической терапии, кровотечениях и предоперационной подготовке больных ИТ основано на взаимодействии рекомбинантного FVII с комплексом gpIb-FIX-FV , что увеличивает количество тромбина на активированной поверхности тромбоцитов.

Если пациент получает ГКС, то за 1-2 дня до операции дозу внутрь необходимо удвоить от первоначальной, в день операции при переходе на внутривенное введение увеличить её еще в 3 раза. После спленэктомии с 3-го

дня послеоперационного периода доза ГКС быстро снижается и к 5-6-му дню послеоперационного периода доводится до исходной. В плане подготовки к проведению спленэктомии перед проведением операции проводится ультразвуковое исследование или компьютерная томография с целью оценки объема селезенки, расположения поджелудочной железы по отношению к воротам селезенки, лимфатических узлов и добавочных долек селезенки. Проведение спленэктомии требует осуществления длительного наблюдения за пациентом, поскольку большинство рецидивов после спленэктомии развивается в течение первых двух лет, но и позже у части пациентов болезнь может рецидивировать.

Рентгенэндоваскулярная окклюзия селезенки является альтернативой спленэктомии и имеет такие же показания. Однако этот метод менее травматичный и позволяет избежать многих осложнений. Суть рентгенэндоваскулярной окклюзии селезенки заключается в поэтапном «выключении» паренхимы органа путем эмболизации селезеночной артерии, катетеризация которой осуществляется через бедренную артерию по методике Сельдингера под рентгенологическим контролем. Эффект окклюзии подтверждается ангиографией. В качестве эмболизирующих материалов используются: вазопресин, желатиновая губка (гельфоам), силиконовые сферы и цилиндры, ивалон, тефлоновый велюр, спираль Гиантурко, баллонированные катетеры.

Симптоматическая терапия при ИТ складывается из гемостатических методов, санации очагов хронической инфекции и применения вазопротекторов.

3.3. КОАГУЛОПАТИИ

Коагулопатии представляют собой геморрагические диатезы, вызванные нарушением синтеза, ингибированием или повышенным потреблением плазменных факторов свертывания крови, результатом чего является нарушение свертывания крови. В педиатрии наиболее часто встречаются коагулопатии в форме гемофилии. Гемофилия - заболевание, вызванное наслед-

ственным дефицитом плазменных факторов свертывания крови VIII, IX или XI. Главный компонент факторов VIII и IX кодируется геном, локализованным в X-хромосоме, поэтому болеют гемофилией в основном мальчики, а носителями дефектного гена являются женщины. Выделяют гемофилию А, обусловленную дефицитом FVIII, гемофилию В (болезнь Кристмаса), связанную с дефицитом FIX и гемофилию С (болезнь Розенталя), вызванную дефицитом FXI плазмы. Описаны приобретенные дефициты факторов VIII и IX при аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваниях, связанные с появлением антител к этим факторам. Распространенность гемофилии в большинстве стран составляет 13-20 на 100 тыс. мужчин или 1:10 тыс. новорожденных мальчиков. При этом соотношение гемофилии А к гемофилии В составляет 4:1.

Гены, кодирующие синтез факторов VIII и IX находятся на длинном плече X-хромосомы: в локусе q28 для FVIII и в локусе q27 для FIX. Поэтому характер наследования гемофилии А и В рецессивный, сцепленный с X-хромосомой. В настоящее время установлено, что генетическими дефектами, приводящими к гемофилии, являются точечные мутации (транзиции, трансверсии), инсерции и делеции. В результате мутаций в гене FVIII или FIX происходит изменение аминокислотного состава, что приводит к синтезу неполноценного белка. Характер мутаций в гене определяет тяжесть течения гемофилии. Малые делеции обуславливают развитие гемофилии легкой и среднетяжелой степени тяжести. Большие делеции почти всегда приводят к развитию тяжелой гемофилии. Наследственный (семейный) характер заболевания имеют 70-80 % пациентов. Спорадические случаи составляют 20 % для гемофилии А и 10 % для гемофилии В. Мутации в гене возникают в сперматогенезе в 3-5 раз чаще, чем в оогенезе, в результате чего в 80-86% спорадических случаев гемофилии матери являются носителями мутации, возникшей в зародышевых клетках их отца. Обнаружена достоверная корреляция между возрастом отца и высокой вероятностью получения от него мутации дочерью-носителем (в среднем 40 лет).

Особенности наследования гемофилии А и В связаны с тем, что у мужчин в генотипе имеется одна X-хромосома и один ген фактора VIII или IX, унаследованный от матери. Поэтому заболевание возникает в том случае, если ген дефектен. У женщин в генотипе две X-хромосомы, соответственно два гена фактора VIII или IX, полученных от родителей. Женщина, имеющая дефектный ген, не имеет клинических проявлений гемофилии, так как нормальный второй ген обеспечивает синтез фактора для участия в процессе свертывания крови. Вероятность того, что обе хромосомы несут дефектный ген, ничтожно мала, потому случаи женской гемофилии встречаются крайне редко - в случае брака больного гемофилией с женщиной-носителем гена гемофилии, при синдроме Тернера, полной или частичной моносомии по X-хромосоме. Все дочери больного гемофилией являются облигатными носителями аномальных генов, все сыновья здоровы. Вероятность того, что сын носительницы гемофилии будет болен гемофилией, составляет 50 %, как и вероятность, что ее дочери получат свойства носителя.

Клинические признаки гемофилии: геморрагический синдром (так как FVIII и FIX не проникает через плаценту, то тенденция к кровоточивости обнаруживается уже в раннем неонатальном периоде (кефалогематомы, кровоизлияния в области ягодиц, кровотечение из пупочной ранки); позже появляются кровотечения при прорезывании зубов, гематомы в местах ушибов и внутримышечных инъекций и др.; с момента самостоятельного хождения ребенка появляются кровоизлияния в суставы (гемартрозы), поражаются крупные суставы: коленные, голеностопные локтевые, кровь в полости сустава вызывает воспаление синовиальной оболочки, повторные кровоизлияния приводят к разрушению хрящевой ткани, развитию остеоартроза, фиброза и анкилоза с последующей атрофией мышц); артропатии и остеопорозы; вторичный ревматоидный синдром (утренняя скованность суставов, артралгии); анемический синдром при кровотечениях

Диагностическими критериями гемофилии является снижение содержания в крови FfVIII (гемофилия А) или FIX (гемофилия В) ниже 40 %, которое наблюдается с детского возраста, при отсутствии признаков болезни Виллебранда и приобретенного иммунного ингибитора FVIII или FIX.

В зависимости от выраженности дефицита фактора свертывания крови и геморрагических проявлений выделяют степени тяжести гемофилии: тяжелая – активность в крови пациента FVIII или FfIX менее 1 %; средняя – активность в крови пациента FVIII или FIX от 1 до 5 %; легкая – активность в крови пациента FVIII или FIX 5 % и более. Активность факторов свертывания в крови измеряют в международных единицах активности (МЕ), за одну МЕ активности фактора VIII (IX) условно принята 100 % активность фактора VIII (IX) в 1 мл нормальной плазмы (пул) (стабилизированной цитратом натрия в соотношении 9:1).

Лечение больных гемофилией осуществляется по патогенетическому принципу, основным компонентом которого является своевременная адекватная заместительная терапия, позволяющая восполнить уровень дефицитного фактора в плазме. Препараты для заместительной терапии гемофилии представляют собой концентрат фактора свертывания. В современной гематологии замещение дефицитного фактора происходит на профилактической основе. Существуют схемы первичной и вторичной профилактики гемофилии.

Первичная профилактика – это регулярно продолжающееся лечение, которое позволяет предупредить кровотечения (внутрисуставные, мышечные и другие) различной локализации. Первичную профилактику гемофилии А и В назначают пациентам в возрасте от 1–2 лет до 18 лет с базовым уровнем FVIII (IX) не более 0,02 МЕ/мл (2,0 %), не имеющим в анамнезе эпизодов внутрисуставного кровоизлияния или имеющим в анамнезе 1–2 эпизода внутрисуставного кровоизлияния и не более 5 дней введения концентрата фактора. Во избежание развития ингибиторной формы гемофилии у пациентов в возрасте до 1 года назначают профилактику ингибиторной формы ге-

мофилии с целью формирования иммунологической толерантности к вводимому концентрату фактора путем длительного (не менее 50 недель) введения малых доз (25–30 МЕ/кг) концентрата дефицитного фактора с кратностью 1 раз в неделю. Перед первым профилактическим введением концентрата F VIII (IX) выполняют исходную коагулограмму (активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время, уровень фибриногена, регистрируют исходный уровень активности F VIII (IX) и уровень ингибиторов к F VIII (IX) и общий анализ крови. После забора крови для выполнения необходимых лабораторных исследований однократно внутривенно вводят стартовую дозу концентрата FVIII (IX) в количестве 25–30 МЕ/кг и регистрируют коагулогический ответ на введение в виде прироста коагуляционной активности крови пациента через 15 минут, 1 час и 2 часа. После введения очередной дозы концентрата фактора регистрируют коагулогический ответ через 15 минут и 1 час. В зависимости от полученных данных осуществляют подбор дозы концентрата фактора для дальнейшего профилактического введения. Введение последующих доз концентрата фактора выполняют 1 раз в неделю. На 5, 10, 20, 30 и 50 день профилактического введения концентрата фактора определяют показатели коагулограммы, активность F VIII (IX), уровень ингибиторов к FVIII (IX). После завершения этапа профилактики ингибиторной формы гемофилии, включающего первые 50 дней введения концентрата фактора, продолжают профилактику геморрагических осложнений, осуществляя дальнейшее введение концентрата фактора в дозе 25–30 МЕ/кг 1 раз в неделю. После 150 дней профилактического введения концентрата фактора пациенту разрешено выполнение профилактических прививок, в том числе путем внутримышечных инъекций, которые осуществляются в день введения очередной профилактической дозы концентрата фактора (25–30 МЕ/кг).

При возникновении на этапе профилактического введения концентрата фактора гемартроза или иного кровотечения, пациенту вводят концентрат

FVIII в дозе 30–50 МЕ/кг 2 раза в сутки или F IX в дозе 50–80 МЕ/кг каждые 18 часов в течение 3–5 дней до исчезновения симптомов кровотечения.

Вторичная профилактика – регулярно продолжающееся лечение у пациентов в возрасте старше 2 лет после 2-х и более внутрисуставных кровоизлияний для поддержания уровня «дефицитного» фактора свертывания крови VIII (IX) в плазме крови не менее 2,1 % (0,021 МЕ/мл). Вторичная профилактика позволяет избежать прогрессирования гемофилической артропатии и инвалидизации пациента. Различают вторичную долговременную и кратковременную профилактику. Долговременная (длительная) вторичная профилактика – это регулярно проводимое лечение, которое назначают пациентам старше 2 лет жизни после более чем 2 внутрисуставных кровоизлияний. Кратковременная вторичная профилактика – это периодически проводимое лечение при наличии следующих показаний: ухудшение качества жизни пациента вследствие тяжелых повторяющихся кровотечений; поражение суставов в виде прогрессирующей артропатии с мышечной атрофией и ограничением объема движений в пораженных суставах; необходимость выполнения планового хирургического вмешательства, включая ранний послеоперационный период; пациентам, с кровотечениями, опасными для жизни; пациентам в период реабилитации. Перед началом вторичной профилактики оценивают степень тяжести заболевания, степень поражения суставов (амплитуда движений (сгибательная, разгибательная, атрофия мышц, фиксированная контрактура), оценивают лабораторные показатели: общий анализ крови (определяют концентрацию гемоглобина; количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов; подсчет лейкоцитарной формулы; скорость оседания эритроцитов); биохимическое исследование крови; определение маркеров вирусного гепатита В и гепатита С; исследование показателей гемостаза (определение активированного частичного тромбопластинового времени, протромбинового индекса, определение концентрации фибриногена, FVIII (IX), ингибитора; общий анализ мочи. Введение концентрата фактора осуществляют на основе индивидуального расчета дозы и кратности введения лекарственного

средства. Перед первым введением концентрата FVIII (IX) выполняют исходное исследование показателей гемостаза с определением активности FVIII (IX), уровня ингибиторов к FVIII(IX) не ранее 7 дней после последнего введения концентрата FVIII (IX). После забора крови для выполнения исходной коагулограммы однократно внутривенно болюсно вводят стартовую дозу концентрата FVIII в количестве 50 МЕ/кг массы тела, концентрата FIX в количестве 50 МЕ/кг массы тела. Через 15 минут после введения стартовой дозы концентрата FVIII (IX) регистрируют коагуляционный ответ путем регистрации активности FVIII (IX) в крови пациента. Через 1 час, 2 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов и 72 часа (96 часов – для гемофилии В) после введения дозы концентрата FVIII (IX) регистрируют коагуляционную активность FVIII (IX) в крови пациента. Интервал введения концентрата фактора равен временному промежутку, в течение которого минимальная остаточная активность «дефицитного» фактора превышает 2 %. Дальнейший мониторинг индивидуального коагуляционного ответа выполняют каждые 6 месяцев на протяжении первого года профилактического введения, а в последующем – каждые 12 месяцев.

Экстренную медицинскую помощь пациентам с гемофилией А и В осуществляют в стационарных условиях, оказывающих специализированную медицинскую помощь. При оказании стоматологической помощи пациентам с гемофилией непосредственно перед удалением зуба(ов) вводят концентрат FVIII в начальной дозе 30–40 МЕ/кг (гемофилия А) или концентрат FIX в начальной дозе 60–80 МЕ/кг (гемофилия В) однократно и продолжают введение по 20 МЕ/кг (FVIII) или 40 МЕ/кг (FIX) каждые 12 часов до эпителизации раневой поверхности (48–72 часа после удаления). При гемофилии легкой и средней степени тяжести допустимо применение десмопрессина назального спрея: по 300 мкг интраназально (150 мкг в каждый носовой ход) за 30 минут до врачебной манипуляции или при кровотечении, повторное введение через 12 часов в течение 3 суток.

Непосредственно перед удалением подлежащих возрастной смене резцов, клыков вводят концентрат FVIII в начальной дозе 15 МЕ/кг, FIX в начальной дозе 30 МЕ/кг однократно. Перед удалением моляров вводят концентрат FVIII в начальной дозе 20 МЕ/кг, FIX в начальной дозе 40 МЕ/кг. В случае кровотечения концентрат фактора вводят однократно в дозе 20 МЕ/кг. Перед удалением постоянных, не подлежащих возрастной смене моляров, концентрат FVIII вводят в начальной дозе 30 МЕ/кг, FIX в начальной дозе 60–80 МЕ/кг, затем FVIII в дозе 15–20 МЕ/кг, FIX в дозе 40 МЕ/кг до остановки кровотечения (2–3 суток).

При кровотечении из слизистой полости рта, носа концентрат FVIII вводят в дозе 20–40 МЕ/кг каждые 8–12 часов до остановки кровотечения, концентрат FIX вводят в дозе 40–60 МЕ/кг каждые 18 часов 3–5 суток.

При гемартрозе иммобилизация конечности, холод на пораженный сустав первые 2 часа. Затем назначают заместительное лечение концентратом FVIII в дозе 20–25 МЕ/кг каждые 12 часов, далее 25–30 МЕ/кг через 12 часов 5–6 дней; концентратом FIX в дозе 40–60 МЕ/кг каждые 24 часа 5–6 дней. При наличии признаков хронического гипертрофического синовита и рецидивирующих гематрозов показана синовэктомия.

При подкожных кровоизлияниях, кровоизлияниях в мягкие ткани и межмышечных гематомах, не угрожающих жизни назначают заместительное лечение концентратом FVIII в дозе 25–30 МЕ/кг через 12 часов 5–6 дней; концентратом FIX в дозе 40–60 МЕ/кг каждые 24 часа 5–6 дней.

При гематурии заместительное лечение концентратом FVIII в дозе 40 МЕ/кг каждые 8–12 часов; концентратом FIX в дозе 40–60 МЕ/кг, затем в дозе 30–40 МЕ/кг каждые 18–24 часа до 5 суток.

При гастродуоденальном кровотечении заместительное лечение концентратом FVIII в дозе 40–50 МЕ/кг каждые 12 часов в течение 2 дней, последующие 2–3 дня в дозе 30–40 МЕ/кг каждые 12 часов, затем в дозе 20–30 МЕ/кг каждые 12 часов на протяжении 7–10 дней; концентратом FIX в дозе 60–80 МЕ/кг, затем 50 МЕ/кг каждые 18–24 часа на протяжении 2–3 суток.

При внутричерепном кровоизлиянии, ретрофарингеальной или ретроперитонеальной гематоме, переломах трубчатых костей, костей таза и обширных межмышечных гематомах заместительное лечение концентратом FVIII в дозе 40–50 МЕ/кг каждые 8–12 часов в течение 2–3 дней до купирования признаков кровотечения, далее поддерживающее лечение в дозе 20–30 МЕ/кг каждые 12 часов в течение следующих 3–5 дней; концентратом FIX в дозе 80–100 МЕ/кг до 3 суток, затем поддерживающая доза 50 МЕ/кг каждые 24 часа в течение 7–9 дней.

При переломах длинных трубчатых костей и костей таза концентрат FVIII в дозе 40–50 МЕ/кг каждые 8–12 часов в течение 5–7 дней до купирования признаков кровотечения, затем назначают поддерживающее лечение в дозе 20–30 МЕ/кг каждые 12 часов в течение последующих 5–7 дней; концентрат FIX в дозе 80–100 МЕ/кг, затем поддерживающая доза 50 МЕ/кг каждые 24 часа до 14 суток.

Для гемостатического обеспечения хирургических вмешательств концентрат FVIII вводят в дозе 40–50 МЕ/кг каждые 12 часов в течение первых 3–4 суток послеоперационного периода с последующим поддерживающим лечением в дозе 20–30 МЕ/кг каждые 12 часов в течение 3–5 суток до момента снятия швов; концентрат FIX в дозе 80–100 МЕ/кг в первые сутки, затем 50 МЕ/кг каждые 24 часа до момента снятия швов.

Ингибиторная форма гемофилии является одним из осложнений иммунного характера. Клинические проявления, связанные с появлением ингибитора: отсутствие ожидаемого гемостатического эффекта от введения расчетной дозы факторного концентрата; утрата эффекта от профилактической терапии путем введения рекомендованной протоколом дозы факторного концентрата; необходимость повышения дозы или увеличения кратности введения факторного концентрата для остановки кровотечения; возможно случайное выявление иммунного ингибитора в результате скрининга.

Ингибиторы обычно возникают после ограниченного количества введений концентрата факторов свертывания крови, чаще в первые 50 дней вве-

дения. Титр ингибитора может изменяться. Ингибитор в низком титре менее 5,0 единиц Бетезда в 1 мл (далее – BU/ml), исчезающий спонтанно в течение 6 месяцев на фоне продолжающейся в прежнем объеме гемостатической заместительной терапии – транзиторный.

Лабораторная диагностика и мониторинг ингибиторной формы гемофилии А и В, молекулярно-генетическое выявление мутаций гена FVIII или FIX, ассоциированных с высоким риском появления иммунных ингибиторов, коагулологическое исследование ингибиторов факторов свертывания крови выполняют в республиканских специализированных центрах. Обследование пациентов с гемофилией на выявление ингибиторов выполняют стандартным методом Bethesda, или методом Bethesda в модификации Nijmegen. Одна единица Бетезда BU/ml (БЕ/мл) соответствует количеству ингибитора в плазме крови, который приводит к снижению 50 % активности FVIII или FIX) в смеси равных объемов плазмы донора и пациента после 2 ч инкубации при 37⁰ С. Минимальный клинически значимый уровень ингибиторной активности составляет более 0,6 БЕ/мл. По типу ингибиторного ответа пациенты разделяются на низкореагирующих (уровень ингибиторной активности на текущий момент менее или равен 5,0 БЕ/мл; отсутствие в анамнезе повышения ингибиторной активности более 5,0 БЕ/мл) и высокореагирующих (уровень ингибиторной активности более 5,0 БЕ/мл).

Профилактика ингибиторной формы гемофилии у детей первых лет жизни заключается в формировании иммунологической толерантности к концентрату фактора для предотвращения образования антител, нейтрализующих коагуляционный эффект вводимого с заместительной или профилактической целью фактора свертывания крови. Профилактику ингибиторной формы гемофилии или поэтапную «тренировку» иммунной системы к восприятию чужеродного белка в качестве собственного фактора свертывания осуществляют у детей первых лет жизни путем длительного (не менее 50 недель) введения малых доз (25–30 МЕ/кг) концентрата фактора с кратностью 1 раз в неделю.

Алгоритм заместительной терапии при геморрагических эпизодах при ингибиторной форме гемофилии:

«низкореагирующий» пациент (постоянно низкий титр ингибитора) – для остановки кровотечения вводят концентрат FVIII (FIX) 20-40 МЕ/кг на каждую единицу ингибитора (максимально до 200 МЕ/кг) плюс гемостатическая доза;

«высокореагирующий» пациент (как правило, высокий титр ингибитора) – прекратить применение концентрата FVIII (FIX); для остановки кровотечения использовать гемостатические лекарственные средства, содержащие концентрат активированного рекомбинантного фактора rVIIa, концентрат активированных и неактивированных факторов свертывания крови (II, VII, X и IX). В последующем исключить введение концентрата FVIII (гемофилия А) или FIX (гемофилия В).

При наличии нескольких факторов неблагоприятного прогноза и при высоком титре ингибитора проводят удаление антител с помощью плазмафереза или иммуносорбции в сочетании с иммуносупрессивными лекарственными средствами.

Для остановки кровотечений, не угрожающих жизни, у пациентов со средней и легкой формами гемофилии А и титром ингибитора менее 5 БЕ/мл, а так же при оперативных вмешательствах не связанных с выполнением полостных операций, артропластики, репозиции фрагментов длинных трубчатых костей и костей таза допустимо применение десмопрессина.

Тактику гемостатической терапии экстренных хирургических вмешательствах при ингибиторной форме гемофилии А и В определяют с учетом тяжести кровотечения, титра ингибитора, предшествующего анамнестического ответа, предшествующего ответа на терапию гемостатическими лекарственными средствами, содержащими концентрат рекомбинантного фактора VIIa, концентрат активированных и неактивированных факторов свертывания крови (II, VII, X и IX).

К редким нарушениям свертывания крови относят моногенные коагулопатии, вызванные дефицитом плазменных белков, участвующих в гемостазе, не относящиеся к болезни Виллебранда и гемофилии А или В. Редкие коагулопатии включают наследственные дефициты или аномалии фибриногена, протромбина (фактора II), факторов свертывания крови V, VII, X, XI, XII, XIII. Все эти нарушения в подавляющем большинстве случаев приводят к нарушениям формирования фибрина. Причинами развития редких форм коагулопатий является, как правило, рецессивное наследование уникального или редких нуклеотидных изменений в генах, кодирующих коагуляционные факторы, или в белках, необходимых для посттрансляционных модификаций данных факторов. Основными задачами лечения пациентов с редкими коагулопатиями являются сохранение физического здоровья пациентов путем профилактики и лечения значимых геморрагических проявлений; обеспечение медицинских условий для физической, психологической и социальной адаптации. В основе лечения пациентов с редкими коагулопатиями лежит специфическая заместительная терапия препаратами, содержащими дефицитный (сниженный или отсутствующий) фактор свертывания крови. При проведении специфической заместительной терапии предпочтение должно отдаваться использованию рекомбинантных или высокоочищенных вирусинактивированных плазматических концентратов факторов свертывания крови.

3.4. ТРОМБОФИЛИИ

Тромбофилия, по определению Британского комитета по гематологическим стандартам, это врожденный или приобретенный дефект гемостаза, приводящий к высокой степени предрасположенности к тромбозам. Результатом повышенной склонности к развитию тромбозов кровеносных сосудов при тромбофилии является нарушение гемореологии и ишемия органов. Тромбофилия может возникать вследствие действия совокупности патогенетических факторов: повреждение сосудистого эндотелия с обнажением

тромбогенных субэндотелиальных структур; активация тромбоцитов вследствие их взаимодействия с субэндотелиальными структурами или фактором Виллебранда; активация свертывания крови; резистентность к антикоагулянтам или дефицит антикоагулянтов; снижение активности фибринолиза; гемодинамические и реологические нарушения, стаз крови.

Различают наследственную (врожденная и ювенильная) и приобретенную тромбофилию (таблица 21).

Таблица 21 – Наследственные и приобретенные тромбофилии

Врожденные (семейные или первичные) тромбофилии	
Дефицит антитромбина III Дефицит протеина C Дефицит протеина S АПС-резистентность Мутация фактора V Лейден Мутация протромбина (20210A) Гомоцистинурия, гипергомоцистеинемия в связи с дефектом ферментов, участвующих в метаболизме метионина	Безусловно подтвержденные данные
Стойкое увеличение концентрации и/или активности факторов свертывания крови: фибриногена, факторов II, VIII, IX или XI Дисфибриногенемия Гипоплазминогенемия и дисплазминогенемия Серповидно-клеточная анемия	Подтвержденные данные
Снижение уровня витамин К-зависимого белка Z и Z-зависимого ингибитора Снижение уровня ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) Дефицит тканевого активатора плазминогена (t-PA) Высокий уровень ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1)	Слабые подтвержденные данные
Полиморфизм фактора XIII (Val34Leu) Повышенный уровень активированного тромбином ингибитора фибринолиза (ТАFI)	Нет подтверждающих данных
Приобретенная или вторичная тромбофилия	
Активный рак (включая миелопролиферативные и миелодиспластические заболевания) Наличие АФА в диагностическом титре (волчаночный антикоагулянт, антикардиолипидные антитела, антитела к анти-β ₂ -гликопротеину I) Аутоиммунные нарушения (синдром Бехчета, глютеиновая болезнь, иммуновоспалительное заболевание кишечника, первичная иммунная тромбоцитопения, тяжелая миастения, ревматическая полимиалгия, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, облитерирующий тромбангиит (болезнь Бюргера), системный склероз, тиреоидит, геморрагический микротромбоваскулит (болезнь Шенлейна–Геноха), гранулематоз Вегенера) Гепарин-индуцированная тромбоцитопения Ночная пароксизмальная гемоглобинурия Инфекция (пневмония, сепсис, инфекция мочевых путей, ВИЧ-инфекция) Гипергомоцистеинемия Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура Дислипидемия, ожирение Микроальбуминурия, нефротический синдром и вероятная хроническая почечная недостаточность Обезвоживание Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром) Беременность, послеродовой период Химиотерапия при лечении злокачественных новообразований (прием L-аспарагиназы, антиангиогенная терапия, цитотоксическая и иммуносупрессивная терапия, применение эритропоэтина, иммуномоделирующая терапия) Терапия эстрогенами или прогестероном Прием селективных модуляторов рецепторов эстрогена (тамоксифена и ралоксифена)	

Классификация тромбофилий включает в себя 10 больших групп, которые отражают изменения на различных уровнях системы гемостаза.

1. Гемореологические формы, характеризующиеся полиглобулинеей, повышением гематокритного показателя, повышением вязкости крови и/или плазмы (в сочетании с гипертромбоцитозом или без него).

2. Формы, обусловленные нарушениями тромбоцитарного гемостаза, связанные с гипертромбоцитозом, повышением агрегационной функции тромбоцитов (спонтанной и под воздействием основных агонистов), уровнем и мультимерностью фактора Виллебранда.

3. Формы, связанные с дефицитом и/или аномалиями первичных физиологических антикоагулянтов — протеинов С и S, антитромбина III, TFPI.

4. Формы, связанные с дефицитом или аномалиями плазменных факторов свертывания крови — аномалией фактора Va и резистентностью его к активированному протеину С, аномалией фактора II, тромбогенными дисфибриногенемиями.

5. Формы, связанные с нарушениями фибринолиза — дефицитом или аномалией тканевого активатора плазминогена и самого плазминогена, избытком их ингибиторов.

6. Формы, связанные с повышением активности и недостаточной инактивацией фактора VII.

7. Аутоиммунные и инфекционно-иммунные формы, в том числе антифосфолипидный синдром; болезнь Бехчета, тиреотоксикоз, системные васкулиты, бактериальный эндокардит, сепсис.

8. Паранеопластические формы: висцеральные формы раковых опухолей различных локализаций (синдром Труссо и др.).

9. Метаболические формы — диабетические ангиопатии, гиперлипидемические формы, тромбофилия при гипергомоцистеинемии и др.

10. Ятрогенные (в том числе медикаментозные) формы — связанные с приемом гормональных контрацептивов, гепарина, фибринолитической терапией, лечением L-аспарагиназой и др.

Патологические изменения, возникающие при онкологических заболеваниях и приводящие к развитию тромбозных осложнений, обусловлены целым комплексом факторов - общие, включающие в себя реакцию организма на наличие злокачественного новообразования, а также факторы, связанные с активностью самой опухоли. Особенностью изменений в систе-

ме гемостаза при онкологических заболеваниях является сочетание активации как тромбоцитарного, так и плазменного звеньев гемостаза. Пусковым механизмом гиперкоагуляции является тканевый фактор, уровень которого в плазме крови повышается в результате его гиперпродукции опухолевыми клетками, в результате чего происходит активация FIX и FX с дальнейшим развитием каскада свертывания крови. Кроме того, в сложный процесс включаются цитокины, в том числе фактор некроза опухолей TNF- α , а также специфические онкологические прокоагулянты, такие как Сазависимая цистеиновая протеаза. Изменения в тромбоцитарном звене гемостаза также обусловлены активностью опухолевых клеток, что приводит к усилению спонтанной агрегации тромбоцитов, а значит и повышению риска тромбообразования на фоне уже свершившихся изменений в системе плазменного гемостаза и системе фибринолиза. В терминальных стадиях неконтролируемые патологические процессы в каскаде свертывания крови, нередко приводят к срыву с развитием ДВС-синдрома.

Наследственная тромбофилия - это генетически обусловленная склонность к образованию венозных тромбозов. Эта форма наблюдается у лиц моложе 45 лет с семейной историей тромбоза и нетипичной локализацией тромбообразования, рекуррентными венозными тромбозами. Наиболее значимыми факторами риска венозных тромбозов является дефицит компонентов системы противосвертывания, а наиболее часто встречающиеся в европейской популяции врожденные тромбофилии – это фактор V Лейден, протромбин G20210A, метилтетрагидрофолатредуктаза (MTFR) C677T. Так, в норме фермент MTFR метаболизирует гомоцистеин в метионин, а при дефекте термолабильной формы этого фермента возникает гипергомоцистеинемия, которая усугубляется при дефиците витаминов B₆, B₁₂ и фолиевой кислоты. Известно, что врожденные тромбофилии в значительно большей степени повышают риск развития венозных, чем артериальных тромбозов (таблица 22). Тромбофилии выявляются лишь у 1/3 больных с венозными тромбозами, а

частота их встречаемости в европейской популяции достигает 10%, что значительно выше, чем частота венозных тромбозов.

Таблица 22 - Врожденные тромбофилии и риск венозных тромбозов (по данным Европейского консенсуса)

Тромбофилия	Частота (%)	
	В популяции	Пациенты с тромбозом глубоких вен нижних конечностей или легочной тромбоэмболией
Дефицит антитромбина	0,07-0,16	1-3
Дефицит протеина С	0,2-0,4	3-5
Дефицит протеина S	0,03-0,13	1,5
Лейденская мутация V фактора свертывания крови	3-15	20
Повышение уровня фактора свертывания крови VIII	1-2	4-7
Мутация протромбина G20210A	5	10
Гипергомоцистеинемия (мутация MTRF C677T)	11	25

По рекомендации Европейского консенсуса по венозным тромбозам скрининг на тромбофилию целесообразно проводить в случаях, когда выше вероятность ее выявления, или ее наличие может повлиять на проводимую терапию:

- венозное тромбоэмболическое осложнение, возникшее спонтанно или в возрасте до 45 лет даже при наличии провоцирующего фактора;
- венозное тромбоэмболическое осложнение у женщин, принимающих гормональные контрацептивы, заместительную гормональную терапию, беременных;
- повторные тромбозы независимо от наличия факторов риска;

- больные с повторным тромбофлебитом поверхностных вен без онкологических заболеваний и варикозного расширения вен;
- нетипичные места локализации тромбов (церебральный венозный синус, вены брыжейки, печени);
- пациенты с индуцированным варфарином некрозом кожи и младенцев с молниеносной пурпурой, не связанной с сепсисом;
- члены семьи носителей тромбофилии, в первую очередь женщин в детородном возрасте;
- повторные выкидыши или гибель плода после 20-й недели;
- тяжелая преэклампсия.

Первичный лабораторный скрининг тромбофилий и отбор групп риска для профилактики тромбозов: количество тромбоцитов (более $500 \cdot 10^9/\text{л}$); гиперагрегация тромбоцитов; гиперкоагуляция; гиперфибриногенемия (свыше 5 г/л); активность факторов VII, VIII, IX (свыше 150 %); уровень растфориных комплексов мономеров фибрина в плазме (свыше 100 мг/л); низкая активность антитромбина, протеина С, протеина S; содержание антифосфолипидных антител (диагностический титр); тест на выявление волчаночного антикоагулянта (положительный); гомоцистеин в крови (выше 11 мкг/мл); нарушение фибринолиза (снижение активности плазминогена и его активаторов, повышение активности PAI-1 и α_2 -антиплазмина); ПЦР – диагностика (наличие мутации Лейден, протромбина или мутации метилтетрагидрофолатредуктазы C677T).

Мутацию гена фактора V (лейденовская мутация), приводящую к резистентности к активированному протеину С, считают наиболее частой причиной высокого риска тромбоза, обусловленного генетическими аномалиями. Данная мутация заключается в аминокислотной замене в молекуле фактора V в том месте, где происходит расщепление молекулы активированным протеином С. При сочетании мутации гена фактора V и гипергомоцистеинемии риск тромбоза увеличивается в 10–20 раз. Замедленная деградация фактора Va приводит к стабилизации протромбиназного комплекса (фактор Ха —

фактор Va — фосфолипиды — ионы кальция) и увеличивает скорость образования тромбина.

Мутация протромбина (20210A) - вторая по частоте причина повышенного риска тромбообразования, обусловленного генетическими нарушениями. При ней почти в 90% случаев выявляют повышенный уровень протромбина (как правило, выше 115%). Риск развития тромбоэмболии при наличии этой мутации возрастает в 3 раза. Наличие одновременно двух и более мутаций приводит к повышению риска тромбоза почти в 100 раз.

Синдром «липких тромбоцитов» - третья по частоте причина повышенного риска тромбообразования, обусловленного генетическими нарушениями. Заболевание связано с повышенной чувствительностью рецепторов тромбоцитов к индукторам агрегации. В развитии осложнений имеет значение стресс, сопровождающийся выбросом адреналина и активацией тромбоцитов. Полиморфизм гена A1/A2 рецептора тромбоцитов к гликопротеину Пб/Ша, по данным мета-анализа, приводит к незначительному (на 5–10%) увеличению риска тромбоза коронарных артерий. Риск развития тромбоза глубоких вен у лиц-носителей аллеля P1A2 (HPA1b) возрастает в 1,8 раза.

Большинство случаев значительной гипергомоцистеинемии (90–95%) обусловлено гомозиготным дефицитом цистатион(он) β-синтетазы, приводящим к нарушению трансформации гомоцистеина в цистатионин. В 5–10% случаев значительная гипергомоцистеинемия обусловлена врождённым нарушением превращения гомоцистеина в метионин в результате гомозиготного дефицита N(5,10)-метилентетрагидрофолат редуктазы, обнаруживаемого с частотой 0– 1,4%. Выявлена значительная связь между гипергомоцистеинемией и сосудистыми тромбозами различной степени выраженности (относительный риск возникновения венозного тромбоза составляет 2,5).

Наследственный дефицит протеина C диагностируют у 10% больных с ТЭЛА и тромбозами глубоких вен. В настоящее время описано свыше 160 различных мутаций протеина C. В результате генетического дефекта протеина C нарушается основная функция активированного протеина C (расщепле-

ние фактора Va и фактора VIIIa, в результате которого происходит инактивация протромбиназы), что приводит к повышенному тромбообразованию. У гомозиготных носителей наследственного дефицита протеина C отмечают неонатальную фулминантную пурпуру. Данное состояние рефрактерно к терапии гепарином или антиагрегантами и чаще заканчивается фатально. Содержание протеина C у гетерозиготных носителей составляет 30–60% от нормального.

Наследственный дефицит протеина S был у гетерозиготных носителей проявляется тромбозами глубоких вен, артериальными тромбозами, ТЭЛА, однако риск развития этих осложнений значительно ниже, чем при дефиците антитромбина или протеина C. У гомозиготных носителей развивается неонатальная фулминантная пурпура.

Наследственный дефицит антитромбина обнаруживают у 3–8% пациентов с ТЭЛА, тромбозами глубоких вен. Риск тромбозов увеличивается при снижении биологической активности антитромбина до 50–70% в результате нарушения основной функции антитромбина - инактивации тромбина и большинства других факторов свертывания крови.

Дефицит плазминогена обнаруживают у 2–3% молодых пациентов с тромбозами глубоких вен. Венозные тромбозы и ТЭЛА развиваются при активности плазминогена ниже 40% от нормы. Наиболее частой генетически обусловленной причиной нарушения функций фибринолитической системы служит увеличение содержания PAI-1 в результате гомозиготного носительства аллеля 4-, что сопровождается повышением риска коронарных нарушений в 1,3 раза и способствует осложнённому течению беременности и послеродового периода.

К ситуациям повышенного риска развития тромбозов на фоне врожденной тромбофилии относятся оперативные вмешательства, травмы, и, в особенности, ортопедические операции. Риск венозных тромбоэмболических осложнений в последнем случае в первую очередь ассоциирован с FV Лейдена, G20210A мутацией гена протромбина, повышенным уровнем FVIII. В то

же время связи дефицита антитромбина III, полиморфизма С677Т метилентетрагидрофолатредуктазы, гипергомоцистеинемии у хирургических пациентов с увеличением опасности развития ОВТ достоверно не выявлено.

Из сопутствующей патологии, способствующей развитию тромбозов, первое место принадлежит онкологическим заболеваниям. Венозные тромбозы являются частым осложнением у пациентов, больных раком, независимо от возраста и пола. Наибольший риск отмечают у онкогематологических больных, при раке легких и желудочно-кишечного тракта. В то же время, по данным ряда исследователей, в этой группе пациентов среди носителей мутации Лейдена и G20210A мутации гена протромбина риск развития тромбоза выше в 12 раз. Клиническими проявлениями наследственной тромбофилии служат тромбоэмболические осложнения в молодом возрасте, венозные тромбозы у лиц без видимых факторов риска (травма, операция, длительная иммобилизация), артериальные тромбозы, атипичная локализация тромбозов (мезентериальные, каротидные, в головном мозге), тромбозы мелких вен кожи, мигрирующие и рецидивирующие тромбозы, инсульты и инфаркты в молодом возрасте, тромбозы на фоне приема гормональных контрацептивов и при беременности.

Самой частой причиной приобретённой тромбофилии бывает антифосфолипидный синдром (АФС) - симптомокомплекс, включающий наличие антифосфолипидных антител, артериальных и венозных тромбозов, невынашивание беременности, иммунную тромбоцитопению и/или неврологические расстройства. Тромбофилическое влияние антифосфолипидных антител обусловлено нарушением функционирования противосвертывающей системы: повреждениями в системе протеина С, вытеснением аннексина V с поверхности клеточной мембраны эндотелия и синцитиотрофобласта, нарушением образования тканевого активатора плазминогена, повреждением мембран эндотелия и индукцией синтеза тканевого фактора, снижением активности антитромбина, подавлением образования простаглицлина эндотелием и изменением функционального состояния тромбоцитов. АФС - системное аутоиммунное

заболевание, характеризующееся рецидивирующими тромбозами и повторными эпизодами гибели плода в присутствии устойчивого повышения антифосфолипидных антител включающих волчаночный антикоагулянт, антитела классов IgG/IgM к кардиолипину и антитела к β 2- гликопротеину I. Антифосфолипидные антитела представляют собой гетерогенную группу аутоантител, которые реагируют на фосфолипиды, фосфолипид – связывающие белки и комплексы фосфолипидов с белками. Антифосфолипидные антитела нацелены, главным образом, на антиген β 2-гликопротеина I и с учетом антител, направленных против протромбина, на их долю приходится более 90 % антительной активности у пациентов с АФС. Хотя большинство антифосфолипидных антител являются специфичными для единственного антигена, выделенные от пациентов антифосфолипидные антитела могли связываться с различными белками, участвующими в каскаде свертывания крови, что свидетельствует о том, что единственный клон, синтезирующий антифосфолипидные антитела, может вызывать множественные изменения в системе коагуляции и влиять на активность клеток, что в итоге может приводить к тромбозам и влиять на активность клеток, что в итоге может приводить к тромбозам. Само по себе присутствие антифосфолипидных антител не означает развитие у пациента АФС. Поскольку у лиц без предшествующего анамнеза тромбоза, в крови которых были выявлены антифосфолипидные антитела, развитие тромбоза в течение последующего пятилетнего периода наблюдения отмечалось лишь в 8,1 %, то возможно сделать заключение о том, что для подтверждения диагноза АФС помимо лабораторных изменений необходимо присутствие клинической картины заболевания. В поддержку этой «дуалистической» гипотезы (или гипотезы «двойного удара») свидетельствует выявление у лиц, с манифестировавшими тромбозами, заболеваний, которые относятся к значимым факторам риска развития тромбоза при АФС, включая гипертензию, наличие аутоиммунных заболеваний, гиперхолестеринемию, наличие антител против ДНК или наличие в среднем титре антител к кардиолипину. Различают факторы риска, предрасполагающие к артериальным или к венозным тромбозам. Факторы риска для развития

артериального тромбоза, включают гипертензию, гипергомоцистеинемию, проведение гормонозаместительной терапии или назначение пероральных контрацептивов. К факторам риска, предрасполагающим к развитию венозных тромбозов, относят гипертриглицеридемию, наследственную тромбофилию или наличие антител класса IgG к кардиолипину в титре более 40 МЕ.

Предварительная классификация и диагностические критерии для верификации АФС были установлены международным консенсусом на конференции в городе Саппоро в 1999 году. С момента выхода работы появились новые клинические, лабораторные и экспериментальные данные, что послужило основанием для нового осмысления полученной научной и клинической информации. Диагностические критерии и классификация были пересмотрены и опубликованы в 2006 году и стали известны как Сиднейские критерии АФС. Для диагностики АФС требуется присутствие комбинации, по меньшей мере, одного клинического и одного лабораторного критерия. Подчеркивается принципиальное значение длительности существования во времени положительных результатов лабораторных тестов. В критериях Саппоро, для признания результатов лабораторных тестов положительными, предлагалось использовать интервал не менее 6 недель.

Клинические критерии:

1. Тромбоз сосудов: один или более клинических эпизодов артериального, венозного тромбоза или тромбоз небольшого сосуда в любой ткани или органе (тромбоз должен быть подтвержден объективными критериями (т.е. должны иметь место однозначные выводы соответствующих визуализирующих исследований или результатов гистологического исследования), при гистологическом исследовании тромбы должны быть без значительных признаков воспаления в стенке сосуда).

2. Патология беременности: один или более необъяснимых эпизодов смерти морфологически нормального плода на или после 10 недели беременности, с нормальной морфологией плода, документированной при ультразвуковом или патоморфологическом исследовании плода; или один или более

эпизодов преждевременных родов морфологически нормальным новорожденным до 34-й недели беременности вследствие: эклампсии или тяжелой преэклампсии диагностированной на основании стандартных критериев или диагностированных признаках плацентарной недостаточности; или три или более необъяснимых спонтанных аборта подряд на сроке до 10 недель беременности при отсутствии у матери анатомических и гормональных нарушений и при исключении хромосомных причин по материнской или отцовской линии.

Лабораторные критерии:

1. В плазме присутствует волчаночный антикоагулянт, выявленный два или более раза на протяжении, по крайней мере, 6 недель, при проведении исследования на основании рекомендаций Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза (верификация факта удлинения фосфолипидзависимой фазы свертывания плазмы по результатам скрининговых тестов, таких как АЧТВ, каолиновое время, тест Рассела с разведением, протромбиновое время, текстариновое время; невозможность откорректировать удлиненное время скрининговых тестов путем смешивания с нормальной бестромбоцитарной донорской плазмой; укорочение времени скрининговых тестов или его нормализация после добавления в исследуемую плазму избытка фосфолипидов; исключение других коагулопатий, например, наличие ингибитора VIII фактора или гепарина (удлиняющих фосфолипид-зависимые тесты свертывания крови).

2. Антитела к кардиолипину изотипа IgG и/или IgM в среднем или высоком титре, выявленные два или более раза на протяжении, по крайней мере, 6 недель.

3. Антитела к $\beta 2$ гликопротеину I изотипа IgG и/или IgM определяемые в высоком титре в сыворотке или плазме два или более раза на протяжении, по крайней мере, 6 недель.

Профилактика и лечение АФС представляет собой сложную проблему, обусловленную особенностями патогенеза АФС, полиморфизмом клиниче-

ских проявлений, а также отсутствием достоверных клинических и лабораторных показателей, позволяющих прогнозировать рецидивирование тромботических нарушений. Основные задачи лечения заключаются в снижении риска развития тромбозов, акушерской патологии, предотвращении рецидивирования тромбозов. Первичная профилактика включает обязательный учет и коррекцию других факторов, повышающих вероятность данного осложнения. Выделяют потенциально контролируемые и неконтролируемые факторы риска тромбозов при АФС. К потенциально контролируемым относят артериальную гипертензию, гиперлипидемию, курение, беременность, прием оральных контрацептивов, активность системной красной волчанки, интеркуррентные инфекции, хирургические операции, стресс, гипергомоцистеинемию, тромбоцитопению, быструю отмену непрямых антикоагулянтов; к неконтролируемым - стойкое увеличение уровня IgG и ВА (рецидивирование тромбозов более тесно связано с увеличением ВА, чем с аКЛ); одномоментное увеличение уровня IgG аКЛ, ВА и анти- β 2-ГП I; дефекты факторов свертывания (мутация фактора V, дефект антитромбина, дефицит протеина C, протеина S).

При высоком уровне антифосфолипидных антител без клинических признаков АФС и отсутствии факторов риска профилактика тромбозов заключается в приеме ацетилсалициловой кислоты в низких дозах (75 мг/сут) и тщательном динамическом наблюдении.

Наличие высокопозитивных антифосфолипидных антител (Ig G >65 GPL; Ig M аКЛ >45 MPL) у пациентов без клинических проявлений АФС ассоциируется со значительным риском тромбообразования и требует проведения комбинированной терапии ацетилсалициловой кислотой в малых дозах (75-100 мг/сут) и гидроксихлорохином (200 мг/сут). Применение гидроксихлорохина, по результатам выполненных исследований, значительно снижает риск тромботических осложнений, что обусловлено его противовоспалительным, гиполипидемическим и антитромботическим (за счет подавления агрегации и адгезии тромбоцитов, уменьшения размера тромба) эффектами.

Медикаментозная коррекция включает прием варфарина под контролем Международного нормализованного отношения (МНО), которое поддерживается на уровне менее 2,0 (оптимально 1,5) в сочетании с гидроксихлорохином (200 мг/сут). Тактика лечения варфарином при АФС идентична таковой при других тромбофилиях и заключается в назначении 2,5—5 мг/сут с последующим подбором оптимальной дозы препарата под контролем МНО.

Развитие тромбозов у пациентов с АФС увеличивает риск повторных тромбозов, частота которых, по различным данным, колеблется от 22 до 70%. После эпизода венозного тромбоза рецидив имеет место в 70%, а после артериального - в 90% случаев. Этот факт является определяющим в тактике лечения пациентов с АФС. Больные с развившимся тромбозом нуждаются в проведении профилактического лечения антикоагулянтами в течение длительного времени. Низкие дозы аспирина обычно не предотвращают повторные эпизоды окклюзий. Прекращение приема антикоагулянтов при АФС способствует рецидиву тромбозов той же локализации или с вовлечением других сосудов. Риск рецидива наиболее высок в первые 6 мес после прекращения приема препарата. Непрямые антикоагулянты, в первую очередь варфарин, являются общепринятыми средствами профилактики тромбозов, эффективность которых доказана длительными исследованиями на большом количестве материала. Основной механизм действия варфарина связан с блокадой в печени синтеза витамин К-зависимых факторов свертывания (II, VII, IX и X). Оптимальное противосвертывающее действие наблюдается на 3 - 5-й день от начала применения препарата и завершается через 3 - 5 дней после приема последней дозы. Начальная доза препарата составляет 2,5 - 5 мг/сут, в последующем она постепенно увеличивается до достижения целевых значений МНО. Всю дозу целесообразно принимать однократно в утренние часы до определения МНО. Прием непрямых антикоагулянтов при несоблюдении условий приема препарата связан с риском развития кровотечений. Вследствие этого лечение варфарином должно проводиться под тщательным кли-

ническим и лабораторным контролем с определением протромбинового времени. Для стандартизации результатов этого теста рекомендуют оценивать МНО, которое учитывает влияние используемого в тесте тромбопластина на величину протромбинового времени. Уровень МНО, необходимый для снижения риска повторных тромбозов, зависит от вида тромбоза: при венозном доза варфарина должна обеспечивать уровень МНО от 2 до 3 (в среднем 2,5); при артериальном тромбозе МНО необходимо поддерживать на уровне более 3. Монотерапия варфарином эффективна в случае венозного тромбоза и часто недостаточна при развитии тромбоза в артериальном русле. В таких случаях возможно проведение комбинированной терапии непрямыми антикоагулянтами и низкими дозами ацетилсалициловой кислоты, которая наиболее оправдана у лиц молодого возраста без факторов риска развития кровотечений (вторичный АФС, тромбоцитопения, нарушение функции тромбоцитов, связанные с присутствием ВА, дефекты протромбина).

У многих пациентов с АФС наблюдаются спонтанные колебания МНО, затрудняющие подбор эффективной и безопасной дозы. Эти колебания могут быть связаны с приемом лекарственных средств, влияющих на метаболизм непрямых антикоагулянтов, многие из которых используются в ревматологии (цитотоксические иммуносупрессанты, глюкокортикоиды, аллопуринол, НПВП, цефалоспорины). Снижают антикоагулянтное действие варфарина барбитураты, эстрогены, антациды, противогрибковые и противотуберкулезные препараты; усиливают НПВП, антибиотики, пропранолол, ранитидин и др. Необходимо помнить, что значительное влияние на развитие эффекта при приеме варфарина оказывает принимаемая пища. Богатая витамином К пища (печень, зеленый чай, брокколи, шпинат, брюссельская и кочанная капуста, репа, салат-латук) способствует развитию резистентности к варфарину. Недоучет этого фактора может привести к неоправданному повышению дозы препарата.

У некоторых больных с АФС отмечается резистентность к антикоагулянтной терапии. В некоторых случаях резистентность к непрямым антикоа-

гулянтам у пациентов с АФС имеет генетическую природу и связана с мутацией V и II факторов. Резистентность и подавление активности протеина C при мутации в гене V фактора свертывания крови (Leiden) определяют дифференцированный подход к лечению больных. При носительстве этой мутации следует крайне осторожно назначать непрямые антикоагулянты, их прием возможен только при тщательном мониторинге уровня протеина C в плазме крови. Как уже указывалось, непрямые антикоагулянты относятся к группе антагонистов витамина K и угнетают не только выработку K-зависимых факторов свертывания (VII, IX, X, II), но и продукцию естественных антикоагулянтов - протеинов C и S, что может привести к усилению тромбофилического статуса и рикошетным тромбозам на фоне терапии прямыми антикоагулянтами, а также к образованию обширных кожных язв.

Таким образом, терапия АФС основывается на синдромном подходе и направлена на профилактику и лечение тромбозов. На основании того, что воспаление и тромбообразование тесно взаимосвязаны, можно полагать, что наиболее эффективными препаратами для лечения АФС будут такие лекарственные средства, которые обладают способностью эффективно блокировать оба (прокоагулянтный и провоспалительный) патогенетических механизма. Современные исследования медикаментозного воздействия на воспаление и управление процессами гемостаза предлагают использовать в терапии АФС ингибиторы циклооксигеназы-2 при резистентности к ацетилсалициловой кислоте, глюкокортикостероиды 1 мг/кг 10-ти дневными курсами 1 раз в 45 дней, ингибиторы АПФ и антагонисты рецепторов ангиотензина II типа I, гиполипидемические препараты, тиенопиридиновые ингибиторы АДФ-рецепторов тромбоцитов, рекомбинантный активированный протеин C, сулодексид и др. гепариноиды, прямые ингибиторы тромбина, ингибиторы FX и тканевого фактора.

Литература

1. Антифосфолипидный синдром / А.В. Колосков [и др.] // Трансфузиология. – 2013. – Т.4. – С. 861-879.
2. Борисевич М.В. Хронический миелоидный лейкоз у детей / М.В. Борисевич // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2016. - Т. 15, №4. – С. 51-56.
3. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: учебное пособие / под ред. Ю.Л. Шевченко. - Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2004. - 224 с.
4. Волкова, С.А. Основы клинической гематологии: учебное пособие / С.А. Волкова, Н.Н. Боровков. – Н.Новгород: Издательство Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. – 400с.
5. Гемостазиология в клинической и лабораторной практике / В.С. Камышников [и др.]// Учебное пособие. - Мн.: Адукацыя і выхаванне, 2011. – 320с.
6. Генетическая диагностика анемии Фанкони / А.В. Панферова [и др.] // Онкогематология. – 2016. – Т. 11, № 3. – С. 76-85.
7. Дмитриев, В.В. Практические вопросы клинической коагулологии / В.В. Дмитриев. – Минск: Белорусская наука. – 2017. – 278с.
8. Железодефицитные состояния в системе мать-плод-ребенок: пособие для врачей / С.Н. Занько [и др.]. - Минск: ИП Кучеренко, 2016. – 52 с.
9. Кадагидзе, З.Г. Иммунная система и рак / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова // Практическая онкология. – 2016. – Т.2, № 17. – С. 62-73
10. Козарезова, Т.И. Анемический синдром в практике педиатра / Т.И. Козарезова, Н.Н. Климкович //Учебное пособие. – Мн.: БелМАПО, 2007. – 226 с.
11. Лабораторные маркеры хронического миелолейкоза / Т.В. Сяпина [и др.] // Биомедицинский журнал (трансфузиология, гематология). - 2011. - Т.12. – С. - 959-979.
12. Литвицкий, П. Ф. Гемобласты. Лейкозы лимфоидного происхождения / П.Ф. Литвицкий, Т. Н. Жевак // Вопросы современной педиатрии. – 2016, Т.5, №15. – С. 457–470.
13. Майборода, А.А. Гены и белки онкогенеза / А.А. Майборода // Сибирский медицинский журнал. - 2013. - Т. 116, № 2. - С. 132-138.
14. Молекулярно –генетические нарушения в патогенезе опухолей системы крови и соответствующие им изменения сигнальных систем клетки / Л.Р. Тилова с соавт. // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т.2. № 10. – С. 235-49.
15. Патофизиология гемолиза и гемолитические анемии у детей / Н.Н. Климкович [и др.] // Учебно-методическое пособие. - Минск: БелМАПО, 2012.- 77 с.
16. Румянцев А.Г. Острый миелобластный лейкоз у детей. Перспективы оптимизации лечения (обзор литературы) / А.Г. Румянцев // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2017. – Т.4, № 1. – С. 30-36.
17. Blood and bone marrow pathology / Ed.by A.Porwit, J.McCullough, W.N. Erber. – 2011. – 708 p.
18. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of European Lukemia Net / М. Vaccarani [et al.] // Blood. – 2006. – Vol. 108(6). – P. 1809-1820.
19. Fancony Anemia: Guidelines for diagnostic and manegment / Fourth edition 2014 Fanconi Anemia Research Fund // Ed.by L. Hays. - Eugene, Oregon. – 2014. – p.421.
20. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer / S. Negrini [et al.] // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2010. – Vol. 11(3). – P. 220-228.
21. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / Ed. by S.H. Swerdlow [et al.] // Lyon: IARC. – 2008. - 439 p.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Обозначения и сокращения	3
Введение	4
Глава 1. Анемии	5
1.1. Молекулярная диагностика анемий	7
1.2. Дефицитные анемии	12
Железодефицитные анемии	12
Витамин В12 дефицитные анемии	19
Фолиеводефицитные анемии	24
1.3. Гемолитические анемии	30
Наследственные гемолитические анемии	35
Аутоиммунные гемолитические анемии	38
1.4. Апластические анемии	46
Наследственные апластические анемии	47
Приобретенные апластические анемии	66
Глава 2. Гемобластозы	77
2.1. Молекулярные основы онкогенеза	76
Биологическая характеристика злокачественной клетки	77
Генетические механизмы опухолевой трансформации	88
Регуляция клеточного цикла в процессе онкогенеза	95
Процессы апоптоза и злокачественной неоплазии	108
Взаимодействие иммунной системы и опухоли	114
2.2. Молекулярная диагностика гемобластозов	123
2.3. Острые лейкозы	130
2.4. Хронический миелолейкоз	159
Глава 3. Гемостазиопатии	168
3.1 Клинические проявления и систематизация гемостазиологических нарушений	168
3.2. Молекулярная диагностика в гемостазиологии	174
3.3. Тромбоцитопении	176
3.4. Коагулопатии	193
3.5. Тромбофилии	204
Литература	220

Учебное издание

Климкович Наталья Николаевна

**ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ
БОЛЕЗНЕЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ**

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Подписано в печать 25.09. 2018. Формат 60x84/16. Бумага «Discovery».

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 13,88. Уч.- изд. л. 10,57. Тираж 100 экз. Заказ 212.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусская медицинская академия последипломного образования.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.

220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.

