

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

ГЕМАТОЛОГІЯ І ПЕРЕЛИВАННЯ КРОВІ

Міжвідомчий збірник
Заснований у 1965 році

Випуск 39

Збірник включено до Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук у медичній та біологічній галузі

Київ – 2017

УДК 616.15+615.38

ББК 54.11я43

ГЗЗ

Збірник рекомендовано до друку Вченою радою ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України» (Протокол № 8 від 30.10.2017 р.)

Редакційна колегія:

Тимченко А. С. (відповідальний редактор), Андреєва С. В. Бруслова К. М., Гаркава К. Г., Гордієнко А. І., Горяїнова Н. В., Козинець Г. П., Кудрявець Ю. Й., Лановенко І. І., Мінченко Ж. М., Настенко О. П. (відповідальний секретар), Новак В. Л., Перехрестенко П. М., Рибальська А. П., Старіков А. В., Третьяк Н. М., Ющенко П. В.

Наша адреса:

04060 м. Київ, вул. М. Берлінського, 12, ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», тел. (044) 440-27-44, e-mail: igt2@ukr.net

Сайт збірника: www.gpk.org.ua

Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник / Випуск 39.
ГЗЗ – К.: МПБП «ГОРДОН», 2017. – _____ с.
ISBN 978-966-326-411-0

Міжвідомчий збірник «Гематологія і переливання крові» вміщує статті, що відображають здобутки фахівців України з клінічної гематології, гемостазіології та виробничої трансфузіології. Представлені результати досліджень, що виконані в науково-дослідних установах **НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, ЯКА ГОТУЄТЬСЯ ДО ВІДЗНАЧЕННЯ 25-РІЧЧЯ ВІД ДНЯ ЗАСНУВАННЯ.**

УДК 616.15+615.38

ББК 54.11я43

*Реєстраційне свідоцтво
Серія КВ № 15171–3743 Р від 30.04.2009 р.*

ISBN 978-966-326-411-0

© ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», 2017

ЗМІСТ

- А. С. ТИМЧЕНКО** АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ Й ІНОВАЦІЙНОЇ СКЛАДОВИХ В ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗИОЛОГІЇ УКРАЇНИ 6
- М. Ю. АНОШИНА, Т. О. КАЛИНИЧЕНКО** ПОКАЗНИКИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ЯК ІНДИКАТОРИ СТАНУ ЕРИТРОЦИТІВ ПУПОВИННОЇ КРОВІ НА ЕТАПАХ ПРОЦЕСУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ: ЗВ'ЯЗОК З ДЕЯКИМИ ІНДИВІДУАЛЬНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ДОНОРА 16
- О. Я. ВИГОВСЬКА** ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ІМУННИХ УСКЛАДНЕНЬ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ 29
- М.І. ВОРОНЯК, М.В. КОКОРУЗ, І.М. ЮРЧИШАК, С.П. МІЛЯШКЕВИЧ** ВИЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЇ V617F ГЕНА JAK2 ПРИ ХРОНІЧНИХ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ 47
- А. І. ГОРДІЄНКО, Н. М. ТРЕТЯК, В. О. КУБАРОВА, Г. С. СТАРОДУБ, Г. А. БОРТНІК** ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ІМУНІТЕТУ ПРИ В-КЛІТИННІЙ ХРОНІЧНІЙ ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ 53
- Н. В. ГОРЯІНОВА** СУЧАСНІ НАПРЯМИ ОПТИМІЗАЦІЇ ЛІКУВАННЯ ДОРОСЛИХ ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ 61
- Ю. Л. ЄВСТАХЕВИЧ, І. Й. ЄВСТАХЕВИЧ, М. М. СЕМЕРАК, О. Я. ВИГОВСЬКА, В. Є. ЛОГІНСЬКИЙ** СПЛЕНЕКТОМІЯ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНИХ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНИХ НЕОПЛАЗІЙ, УСКЛАДНЕНИХ АВТОІМУННОЮ ГЕМОЛІТИЧНОЮ АНЕМІЄЮ 77
- О. В. ЗОТОВА, А. С. ЛУК'ЯНОВА, М. О. ВАЛЬЧУК, І. С. ВАНЬКО, С. В. ОСІДАЧ, М. М. РИМАР, Ю. С. КАРОЛЬ, В. Є. ЛОГІНСЬКИЙ** ДІАГНОСТИЧНЕ ТА ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ СПРИЯТЛИВИХ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ 88
- В. В. КРАСІВСЬКА, О. В. СТАСИШИН** ЛАБОРАТОРНІ КРИТЕРІЇ ДІАГНОСТИЧНОЇ ПРИДАТНОСТІ РУТИННИХ КОАГУЛОЛОГІЧНИХ ТА ТЕСТІВ НА ВИЯВЛЕННЯ ВОВЧАКОВОГО АНТИКОАГУЛЯНТУ У ПАЦІЄНТІВ З ПІДОЗРОЮ НА АНТИФОСФОЛІПІДНИЙ СИНДРОМ 97
- І. І. ЛАНОВЕНКО, Г. П. ГАЩУК** РЕАКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНУ ЕРИТРОЦИТІВ І КИСНЕВОТРАНСПОРТНОЇ ФУНКЦІЇ КРОВІ ПРИ ГЕМІЧНІЙ ГІПОКСІЇ ГІПОПЛАСТИЧНОГО ГЕНЕЗУ 109
- В. В. ЛЮБИЧ** ВИРОБНИЦТВО ПРЕПАРАТІВ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ В УКРАЇНІ ТА КОНТРОЛЬ ЇХНЬОЇ ЯКОСТІ 121
- В. В. ЛЮБЧАК, А. С. ТИМЧЕНКО, І. В. АНЦИФЕРОВА** ВИЯВЛЕННЯ КРИТИЧНИХ ЛАНОК В ЗАБЕЗПЕЧЕННІ ЯКОСТІ КОМПОНЕНТІВ КРОВІ ПРИ ПІДГОТОВЦІ ЇХ ДО ГЕМОТРАНСФУЗІЙ 128

- С. Є. МАДИЧ, Т. В. ДАНИШ** ВЛАСТИВОСТІ ТА МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ ФАКТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ VII **135**
- О. В. МИРОНОВА, А. Г. МАЗУР, Н. В. ГОРЯІНОВА** ГАСТРОСЦИНТИГРАФІЧНІ ОЗНАКИ МОТОРНО-ЕВАКУАТОРНИХ ПОРУШЕНЬ ШЛУНКУ ПІСЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ **139**
- Л. М. НЕМИРОВСЬКА, Ю. С. ПОНОМАРЕНКО, А. П. РИБАЛЬСЬКА, М. М. МАЗУР** ДИСБІОТИЧНІ ЗМІНИ МІКРОБІОТИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ ЛЕЙКЕМІЮ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ВІДНОВЛЕННЯ **149**
- В. Л. НОВАК, Д. М. КУРГАН, М. В. КОКОРУЗ, Ю. В. ДЕРКАЧ, В. Є. ЛОГІНСЬКИЙ, С. В. ПРИМАК, М. Г. КУРГАН** РЕЗУЛЬТАТИ ІМУНОТЕРАПІЇ ТА МІСЦЕВОГО АНТИСЕПТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ УРАЖЕНЬ ШКІРИ ПРИ ГРИБОПОДІБНОМУ МІКОЗІ ТА СИНДРОМІ СЕЗАРІ **160**
- О. І. ОСАДЧА, Г. П. ХИТРИЙ** ДИНАМІКА ЗМІН ПРО- ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ПОСТТРАВМАТИЧНИХ З ХОЛОДОВОЮ ТРАВМОЮ **172**
- Р. П. ПАВЛЮК, Г. А. МИРОНЕНКО, У. В. ТИМОШЕНКО** ЯКІСНЕ ОБСТЕЖЕННЯ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ – ЗАПОРУКА БЕЗПЕЧНОСТІ ТРАНСФУЗІЙНОЇ ТЕРАПІЇ **179**
- П. М. ПЕРЕХРЕСТЕНКО, В. М. САМУСЬ, О. М. АЛАДЬЄВА** АНАЛІЗ ДІЯЛЬНОСТІ ЗАКЛАДІВ СЛУЖБИ КРОВІ УКРАЇНИ У 2016 РОЦІ **189**
- А. П. РИБАЛЬСЬКА, Л. М. НЕМИРОВСЬКА, О. І. ГАЗЯ, О. А. МЕЛЬНИК Н. К. СКАЧКОВА** ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРУ ТА ПЛОЩІ БІОПЛІВКИ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ У КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ **200**
- С. Ю. СЕРГУТІНА, С. В. БУРНАЄВА, С. О. СІВКОВИЧ** ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ХВОРИХ НА ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНІ НОВОУТВОРЕННЯ **209**
- М. І. СІМОНОВА, О. Й. ДАНИШ, Х. Р. СУСІДА, З. В. МАСЛЯК** ПРОЗАПАЛЬНІ ТА ПРОАГІОГЕННІ ЦИТОКІНИ У ХВОРИХ НА СПРАВЖНЮ ПОЛІЦИТЕМІЮ РІЗНОГО ПРОФІЛЮ РИЗИКУ **220**
- А. В. СТАРІКОВ, Л. В. БАРОНСЬКА** ІНФУЗІЙНА ТЕРАПІЯ ПРИ КРИТИЧНИХ СТАНАХ **227**
- А. В. СТАРІКОВ, Л. В. БАРОНСЬКА** ФІБРИНОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ КРОВІ ПРИ ІНТЕНСИВНІЙ ЦИТОСТАТИЧНІЙ ТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА ЛЕЙКЕМІЮ **232**
- Г. С. СТАРОДУБ, Н. В. ГОРЯІНОВА, О. В. БАСОВА, Т. П. ПЕРЕХРЕСТЕНКО, В. О. КУБАРОВА, Н. М. ТРЕТЯК А. І. ГОРДІЄНКО** ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИМИ КЛІТИНАМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ МЕМБРАННИХ АНТИГЕНІВ CD34, CD117, CD33, CD38 У ХВОРИХ НА МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНИЙ СИНДРОМ РЕФРАКТЕРНУ АНЕМІЮ ІЗ НАДЛИШКОМ БЛАСТІВ ІІ В ДИНАМІЦІ ЗАХВОРЮВАННЯ **236**

У. В. ТИМОШЕНКО ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ У ПАЦІЄНТІВ З В-КЛІТИННИМИ НЕХОДЖКІНСЬКИМИ ЛІМФОМАМИ **246**

О. О. ШАЛАЙ, Г. Б. ЛЕБЕДЬ, В. А. БАРІЛКА, Я. І. ВИГОВСЬКА, Н. Я. ТОМАШЕВСЬКА, В. Є. ЛОГІНСЬКИЙ ЕКСПРЕСІЯ CD38 І ВУГЛЕВОДНІ ДЕТЕРМІНАНТИ ЛЕЙКЕМІЧНИХ В-ЛІМФОЦИТІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ **260**

Є. В. ШОРОП, С. М. ШОРОП ЕФЕКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТРОМБОЦИТІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ІДІОПАТИЧНОЇ ТРОМБОЦИТОПЕНІЧНОЇ ПУРПУРИ **270**

Н. О. ШУРКО НОВИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСУ ФАКТОРІВ VIII-ФОН ВІЛЛЕБРАНДА **278**

УДК 615.38+616.15

АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ Й ІНОВАЦІЙНОЇ СКЛАДОВИХ В ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗИОЛОГІЇ УКРАЇНИ

А. С. Тимченко

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. В роботі представлено аналіз матеріалів по реалізації пріоритетних напрямів розвитку наукової, науково-технічної й інноваційної складових гематології та трансфузіології.

Ключові слова: стратегія розвитку, методи діагностики, компоненти крові, молекулярні і клітинні технології, управління якістю лікування, інфузійно-трансфузійна безпека.

ACTUAL PROBLEMS OF SCIENCE AND TECHNOLOGY AND INNOVATION COMPONENTS OF HEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY IN UKRAINE

A. S. Tymchenko

SI "Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine", Kyiv

Summary. The job presents an analysis of materials on the implementation of priority development directions science, science and technology, and innovation components of hematology and transfusion.

Key words: development strategy, method of diagnostics, components of blood, molecular and cellular engineering, quality management of treatment, infusion-transfusion safety.

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України» є провідною науковою установою України з питань гематології та трансфузіології. З 1936 року Інститут визначає напрями розвитку наукової галузі, курує діяльність закладів служби крові та профільних гематологічних відділень лікувальних закладів.

Колектив ДУ «ІГТ НАМН» працює над удосконаленням законодавчої та нормативної бази служби крові, підготовкою концепцій та програм її розвитку, розробкою та впровадженням нових медичних технологій, що базуються на принципах доказової медицини, відбором і впровадженням методів діагностики та лікування з найкращим співвідношенням ефективності медичної допомоги та економічної доцільності для України, розширенням діагностичних

можливостей профільних відділень завдяки використанню нових, науково обґрунтованих алгоритмів обстеження та моніторингу ефективності лікування хворих. Постійно приділяється увага фундаментальним дослідженням патогенезу злоякісних захворювань кровотворної та лімфоїдної тканини, що виконуються з урахуванням новітніх досягнень теоретичної гематології і застосуванням методів імунофенотипування, цитогенетики, молекулярної біології та ін.

Отримані в лабораторіях Інституту результати досліджень системи гемостазу значно розширили можливості профілактики та лікування хворих з тромбозами та тромботичними ускладненнями, що залишаються однією з основних причин смерті серед населення як України, так і інших країн.

Метою стратегічного розвитку ДУ «ІГТ НАМН» є реалізація пріоритетних напрямів розвитку наукової, науково-технічної й інноваційної складових гематології і трансфузіології та створення умов для підвищення ефективності наукових досліджень і використання їх результатів у діяльності багатьох розділів медицини.

Організаційна структура гематологічної допомоги дорослому населенню України представлена лікувально-діагностичним комплексом, що складається з гематологічних відділень і гематологічних кабінетів. Крім того, у центральних районних лікарнях працюють спеціалісти з гематології, лікарі-терапевти, які здійснюють нагляд за хворими з патологією системи крові за місцем проживання. В Україні функціонують 32 гематологічних відділення, де працює 319 лікарів-гематологів. Забезпеченість гематологічними ліжками задовільна і становить 3,0:100000 населення.

Загальним напрямком розвитку фундаментальних досліджень у секторі гематології є вивчення етіології та патогенезу захворювань системи крові. Результати різнобічних досліджень клітинно-молекулярних механізмів розвитку гематологічних хвороб поглиблюють наші знання щодо етіології та

патогенезу захворювань системи крові і дозволяють запропонувати нові діагностичні та лікувальні алгоритми.

Застосування комплексних методів терапії дозволило продовжити терміни життя хворих на гостру лейкемію, які перебувають у ремісії, до 3-5 років у 35-40% випадків і віддалити строки інвалідизації хворих на хронічні захворювання системи крові і лімфоїдної тканини.

Проте, у діяльності гематологічної служби України існують труднощі та невирішені проблеми: гематологічні відділення і кабінети недостатньо забезпечені необхідною діагностичною апаратурою, інструментами, реактивами та лікувальними препаратами. У більшості областей в гематологічних відділеннях не обладнані асептичні бокси та палати інтенсивної терапії, що виключає можливість застосування нових раціональних програм хіміотерапії з використанням високоактивних протилейкозних препаратів. Повільно налагоджується комп'ютеризація гематологічної служби.

Основні завдання, над якими працює інститут.

➤ Вивчення механізмів злоякісних перероджень клітин крові в процесі онкогенезу, що викликаний різноманітними факторами, серед яких нині найбільше значення надається генетичним регуляторам, що змінюють рівні експресії антионкогенів і протоонкогенів та ролі цитокінів, гормонів, білків-транспортів, маркерів апоптозу та проліферації, факторів росту тощо, що контролюють виживання, проліферацію та диференціювання клітин.

➤ Дослідження кисневозалежних механізмів виникнення та прогресії захворювань системи крові: визначення ролі еритропоетину, оксиду азоту та глутатіону.

➤ Визначення клітинно-молекулярних основ виникнення медикаментозної резистентності при гемобластозах та створення ефективних систем прогнозування перебігу захворювань системи крові на основі застосування молекулярних, цитогенетичних, імунологічних, біохімічних та морфологічних методів дослідження.

➤ Розробка технологій криозахисту гемопоетичних клітин пуповинної/плацентарної крові та їх мікрооточення надає підстави для клопотання про створення на базі інституту Національного банку пуповинної крові для алогенного клінічного застосування при захворюваннях системи крові.

➤ Створення та підпорядкування службі крові України донорських банків довгострокового зберігання пуповинної крові, компонентів крові та гемопоетичної тканини. Організація національного реєстру донорської гемопоетичної тканини з подальшим входженням у міжнародні пошукові системи для забезпечення міжнародного обміну.

➤ Вдосконалення діагностики пухлинних захворювань системи крові із використанням молекулярних та клітинних технологій. Пошук нових способів лікування та вдосконалення методів контролю мінімальної залишкової хвороби злоякісних новоутворень.

➤ Розробка національних стандартів надання медичної допомоги хворим гематологічного профілю на рівні первинної, спеціалізованої (вторинної, третинної) та екстреної допомог.

➤ Впровадження в сферу гематології, трансфузіології та комбустіології принципів доказової медицини і міжнародних стандартів надання медичної допомоги.

➤ Розробка нового покоління внутрішньовенних нормальних і специфічних імуноглобулінів для терапії інфекційних та аутоімунних захворювань.

➤ Підвищення ефективності супровідної терапії при захворюваннях системи крові та лімфоїдної тканини, визначення інформативних діагностичних маркерів виникнення інфекційно-запальних, геморагічних та тромботичних ускладнень.

➤ Визначення розладів та можливостей корекції порушень гемостазу, створення діагностично-лікувальних протоколів для надання медичної допомоги пацієнтам з коагулопатіями та тромбоцитопатіями. Підвищення ефективності спеціалізованої медичної допомоги, включно з ортопедо-хірургічною допомогою хворим на гемофілію.

➤ Наукове обґрунтування стратегії розвитку донорства крові, зокрема системи управління якістю донорської крові та її компонентів, і створення нових технологій вірусінактивзації плазми крові та отримання вірусбезпечних препаратів та компонентів на її основі.

➤ Підвищення рівня імунологічної безпеки гемотрансфузійної терапії в аспекті визначення груп крові, імунних антитіл та алосенсибілізації населення.

➤ Розробка нових технологій отримання препаратів протеїнів з донорської плазми.

➤ Дослідження впливу інфузійних розчинів на величину показників системи фібринолізу у пацієнтів з ендogenous інтоксикацією.

➤ Створення та впровадження нових методів хірургічного лікування і реабілітації пацієнтів з опіковою хворобою.

➤ Наукове обґрунтування та створення реєстрів осіб із захворюваннями системи крові та лімфоїдної тканини, гемофілією та іншими коагулопатіями.

➤ Розширення міжнародного наукового співробітництва в галузі гематології, трансфузіології і комбустіології та сприяння співробітництву з науковими, лікувально-профілактичними і навчальними закладами, НАН, МОЗ, НАМН України.

Важливим напрямком гемотрансфузіології є трансплантація гемопоетичної тканини як метод лікування гематологічних хворих, які потребують заходів по створенню запасів гемопоетичних клітин, отриманих із різних джерел.

Проведенню досліджень з культивування клітин, методів криозберігання та вивчення можливостей трансплантації зразків від декількох донорів.

Створенню на базі інституту Національного банку пуповинної крові та її компонентів для довгострокового зберігання.

Перспективними напрямками розвитку гемостазіології є обґрунтування, розробки та удосконалення нормативних документів, що регламентують діяльність медичних закладів щодо діагностики і лікування патологій системи

гемостазу, визначення частоти і ролі гемостазіопатій у формуванні ситуацій із захворюваністю в Україні.

Вивчення впливу чинників дезадаптації перебігу реакцій системи гемостазу при гемостазіопатіях, хворобі Віллебранда, гемофілії та розробка методології генетично-молекулярної діагностики патологій системи гемостазу у хворих на спадкові гемостазіопатії.

Патогенетичне обґрунтування, застосування та розробка сучасних ортопедо-хірургічних та репаративних технологій для лікування хворих на гемофілію.

Важливими завданнями прикладних наукових досліджень є вдосконалення організації служби інтенсивної терапії важких ДВС-синдромів, масивної крововтрати, іншої гострої патології гемостазу, розробка комплексних програм діагностики та лікування інфекційних і геморагічних ускладнень у гематологічних хворих, що залишаються основними причинами смерті серед цього контингенту хворих.

Сучасна трансфузіологія потребує вирішення низки важливих завдань, що визначають перспективи наукових досліджень в галузі, серед них пріоритетними є заходи щодо постійного підвищення ефективності та безпеки інфузійно-трансфузійних біопрепаратів, зокрема, в зв'язку із ризиком інфікування пацієнтів різними патогенами. Мінімізація посттрансфузійних ускладнень.

► Розвиток ауто донорства, включно з використанням цитокінів та еритропоетину, як шлях до забезпечення імунологічної безпеки трансфузій гемокомпонентів і збільшення об'ємів крові.

► Обґрунтування зменшення числа та об'єму гемотрансфузій при оперативних втручаннях завдяки визначенню чітких показань до переливання компонентів і препаратів плазми крові, перехід на інноваційні технології, що забезпечать випуск сучасних трансфузійних препаратів для лікування коагулологічних порушень та ендогенної інтоксикації різного генезу.

► Створення нових вітчизняних колоїдних і сольових розчинів різної молекулярної маси та препаратів, що їх дія спрямована на забезпечення газотранспортної функції крові.

► Вивчення причин і механізмів рефрактерності до трансфузій концентрату тромбоцитів і відсутності гемостатичного ефекту.

Для ефективного лікування тромбозів та геморагічних ускладнень перспективним також є розробка нового покоління антиагрегантів та гемостатичних засобів на основі застосування наноматеріалів.

У сфері виробничої трансфузіології важливим є наукове обґрунтування стратегії розвитку донорства крові в Україні, системи управління якістю донорської крові та її компонентів, впровадження сучасних методів скринінгу інфекційних агентів, комплексної інактивації компонентів крові, розширення спектру біопрепаратів, виготовлених із плазми крові (фактори зсідання крові, імуноглобуліни для внутрішньовенного застосування та киснево-транспортні препарати).

Перехід на безвідходне виробництво ширшого спектру білкових препаратів плазми крові і створення заводу-фракціонатора, що особливо важливо для України в умовах дефіциту донорських кадрів, інфекційної безпеки та підготовки висококваліфікованих кадрів для виробничої трансфузіології.

Стратегічні напрями в гематології стосуються накопичення і аналізу знань відносно молекулярно-генетичних, цитогенетичних, імунологічних, біохімічних механізмів патогенезу захворювань системи крові, дослідження міжклітинної взаємодії на основі моніторингу спектру та вмісту цитокінів, ферментів, кількісної оцінки експресії онкомаркерів лейкемій і лімфом, цитогенетична характеристика клітин системи крові та лімфоїдної тканини, визначення клітинно-молекулярних основ медикаментозної резистентності.

Вивчення пошкоджень киснево-транспортної системи при захворюваннях крові та у післяопераційних станах у хворих на гемофілію.

Створення ефективних систем ранньої діагностики та прогнозування перебігу захворювань системи крові.

Визначення молекулярних, цитогенетичних, імунологічних та біохімічних маркерів патологічних клітин, використання моноклональних антитіл.

Підвищення ефективності лікування захворювань системи крові шляхом впровадження ауто/алотрансплантацій, трансплантації клітин кісткового мозку, стовбурових клітин пуповинної крові.

Визначення заходів щодо контролю якості надання медичної допомоги та розробка методів підвищення ефективності супровідної терапії у хворих на лейкемію, визначення інформативних діагностичних і прогностичних маркерів інфекційно-запальних ускладнень, виявлення порушень гуморального та клітинного імунітету.

Вивчення якості життя пацієнтів із хворобами крові, як важливого показника ефективності лікування.

Створення Національного центру лікування коагулопатій, реєстрів хворих на гемофілію та інші приховані гемостазіопатії.

Розробка загальнонаціональних навчальних планів і програм циклів спеціалізації та передатестаційної підготовки за фахом «трансфузіологія», впровадження в практику якісних імуногематологічних тестів для обстеження донорів, реципієнтів, вагітних та немовлят.

Науковий супровід та розробка стандартів тканинного типування, проведення високоспеціалізованої лабораторної та консультативної допомоги при неможливості визначення груп крові, резус-належності та ін.

Складнощі соціально-економічного характеру, що спостерігалися останнє десятиріччя в державі, мали негативні наслідки для розвитку вітчизняної служби крові. Відсутність адекватного фінансування призвела до того, що матеріально-технічна база більшості закладів служби крові виявилася морально та фізично застарілою, що суттєво стримує впровадження у практику нових

світових та вітчизняних технологій забезпечення безпеки та ефективності гемотрансфузійної терапії. Численні заклади служби крові мають малу потужність та працюють неефективно. Слабка матеріально-технічна база закладів служби крові, брак якісних вітчизняних витратних матеріалів та устаткування не дозволяють вирішувати найважливіші завдання служби крові і забезпечувати безпеку та ефективність всіх етапів гемотрансфузійного «ланцюжка» – від заготівлі крові та її компонентів до їхнього клінічного застосування.

Заходи з підвищення безпеки гемотрансфузійної терапії регламентовані низкою наказів та вказівок Міністерства охорони здоров'я України. Однак, їхня реалізація відбувається повільно, що створює умови для виникнення посттрансфузійних ускладнень інфекційного та неінфекційного характеру. Недостатнє впровадження сучасних методів заготівлі плазми та клітинних компонентів крові призводить до неефективного використання, й без того, обмежених донорських ресурсів. Вимагають покращення методи скринінгу донорської крові. Не використовуються сучасні методи вірусної інактивації компонентів та препаратів крові.

В незадовільному стані знаходиться вітчизняне виробництво препаратів плазми крові, що не відповідає потребам охорони здоров'я ні за номенклатурою, ні за об'ємом, ні за якістю продукції, що випускається. Жодне з існуючих в Україні виробництв препаратів крові не відповідає міжнародним стандартам. Промисловий випуск ряду найважливіших препаратів плазми крові (наприклад, фактори згортання крові VII та IX) відсутній, тому вони закуповуються за високими цінами за кордоном. Вкрай недостатньо випускають нормальні та специфічні імуноглобуліни. Забезпечення вітчизняних лікувально-профілактичних закладів препаратами плазми крові становить 17-25% від нормативів, рекомендованих ВООЗ. Дефіцит високоякісних і ефективних препаратів крові вимушує лікувально-профілактичні заклади використовувати менш ефективні препарати в гемотрансфузійній терапії.

Настала необхідність оптимізувати мережу закладів служби крові (в межах реформування загальної системи охорони здоров'я) шляхом централізації матеріаломістких та високовартісних процесів (переробка, тестування, зберігання та керування запасами компонентів крові) в обласних центрах служби крові.

Узагальнюючи, слід зазначити, що для вирішення проблеми самозабезпечення країни високоякісними безпечними білковими препаратами плазми крові необхідне створення, на принципово новому рівні, індустрії переробки плазми, що включає в себе модернізацію існуючих обласних центрів фракціонування плазми та будівництво сучасного потужного плазмопереробного виробництва на основі впровадження найновіших технологій повного циклу переробки плазми (з подвійною вірусінактивацією). Ці, та інші заходи, можуть бути реалізовані лише за умови вдосконалення організаційних основ донорської бази, створення інфраструктури заготівлі, зберігання та транспортування ліцензованої свіжозамороженої плазми як сировини для виробництва препаратів крові. На основі вищевикладеного, на часі вирішити питання щодо контрактної та ширшої переробки ліцензованої плазми крові.

Вищезазначені завдання вимагають, щоб фінансування, технологічне і кадрове забезпечення напрямів гематології та трансфузіології, що мають стратегічне значення для держави (особливо при різних надзвичайних ситуаціях і військових конфліктах) та сприяють успіху при виконанні складних хірургічних втручань у багатьох розділах клінічної медицини, здійснювались не за залишковим принципом, а були достатніми для якіснішого їх виконання.

Література

1. Тимченко А. С. Фундаментальные и прикладные аспекты в гемотрансфузиологии: особенности инфузионно-трансфузионной терапии при геморрагическом шоке в пожилом возрасте / Тимченко А. С. // Гематология и трансфузиология. Восточная Европа. – Минск, 2017. – Том 3, № 4. – С. 825-832.

2. Основи законодавчого забезпечення діяльності фахівців в службі крові та гематології: керівництво для лікарів / за ред. проф. Видиборця С. В., проф. Михайличенка Б. В. – К.: НМАПО імені П. Л. Шупика, 2014. – 588 с.

3. Тимченко А. С. Система менеджменту якості в закладах служби крові України (основні положення): методичні рекомендації/А. С. Тимченко, В. В. Любчак. – К., 2014. – 28 с.

4. Шиффман Ф. Д. Патолофізіологія крові. / Шиффман Ф. Д. // М.: Бинум, 2014. – 448 с.

5. Діяльність закладів служби крові України у 2016 році: довідник/ П. М. Перехрестенко, А. С. Тимченко, О. І. Малигон – К.: ТОВ «Діа», 2017. – 76 с.

6. Рагимов А. А. Трансфузіологія. / Рагимов А. А. – М.: Гэотар-Медиа, 2012. – 1184 с.

7. Замковий А. Д. Практика інфузійно-трансфузійної терапії при гострих крововтратах./ Замковий А. Д., Видиборець С. В.// Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. – К., 2015. – Вип. 38. – С.150-159.

Надійшла 02.11.2017 року.

УДК 616.153.915: 611-018.51+611-013.68+615.387+615.38

**ПОКАЗНИКИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ
ЯК ІНДИКАТОРИ СТАНУ ЕРИТРОЦИТІВ ПУПОВИННОЇ КРОВІ НА
ЕТАПАХ ПРОЦЕСУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ: ЗВ'ЯЗОК З ДЕЯКИМИ
ІНДИВІДУАЛЬНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ДОНОРА**

М. Ю. Аношина, Т. О. Калиниченко

ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України", Київ

***Резюме. Мета.** Визначити показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у еритроцитарних компонентах пуповинної крові (ПК) на етапах процесу кріоконсервування та їх залежність від деяких індивідуальних характеристик донора, а саме: статі, групової АВ0 та резус-приналежності.*

***Матеріали і методи.** В еритроцитарних компонентах ПК на етапах кріоконсервування спектрофотометричним методом вимірювали концентрацію продуктів ПОЛ, що дало змогу в одній пробі охарактеризувати одночасно весь спектр змін*

активності процесів пероксидації (за вмістом субстратів, первинних, вторинних та кінцевих молекулярних продуктів).

Результати. Встановлено наявність вірогідної різниці показників перекисного окислення як нейтральних ліпідів, так і фосфоліпідів на всіх етапах технологічного процесу кріоконсервування у групах зразків, що мають різну АВ0 групову приналежність. Найбільш стійкими до негативних факторів кріоконсервування за показниками ПОЛ є еритроцити АВ(IV) групи крові. Показано, що активність процесів перекисного окислення ліпідів в еритроцитарних компонентах ПК не залежить від статі та резус-приналежності донора.

Висновки. Результати дослідження ПОЛ у еритроцитарних компонентах ПК свідчать про існування певних зв'язків між окремими індивідуальними характеристиками фенотипу донора, до яких відноситься і АВ0-груповою приналежністю крові, та збереженістю мембран еритроцитів при екстремальних впливах.

Ключові слова: перекисне окислення ліпідів, еритроцити, пуповинна кров, кріоконсервування, кріочутливість.

THE LIPID PEROXIDATION ACTIVITIES AS INDICATORS OF UMBILICAL CORD RED BLOOD CELL STATUS ON THE CRYOPRESERVATION PROCESS STAGES: COMMUNICATION WITH SOME INDIVIDUAL DONOR CHARACTERISTICS

M. Yu. Anoshyna, T.O. Kalynychenko

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. Aim. To determine the indices of the lipid peroxidation (LPO) in the umbilical cord red blood cell (UCRBC) components and their dependence on some individual donor characteristics, namely: sex, AB0 group and resuscitation.

Materials and methods. The LPO products concentration in the UCRBC components on the cryopreservation stages was measured spectrophotometrically for a simultaneous (in one sample) characterization of the full spectrum of the LPO processes (using quantitative studies of the substrates and the primary, secondary, and final molecular products).

Results. The peroxide oxidation indicator differences were established both in the case of neutral lipids and phospholipids on samples with different AB0 group affiliation at all stages of the technological cryopreservation process. According to the data, UCRBCs with AB (IV) were the most resistant to the cryopreservation negative factors. The donor's sex and rhesus belongings were not related to LPO's activities in the studied components.

Conclusions. The results of the LPO studies in the UCRBC components indicate that there are certain associations between some individual donor phenotypic characteristics (including AB0-group belonging) and the safety of the erythrocyte membranes at extreme exposures such as cryopreservation.

Key words: erythrocytes (red blood cells), umbilical cord blood, cryopreservation, lipid peroxidation, cryosensitivity

Вступ. Показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) є важливим елементом оцінки гомеостазу біологічного об'єкту, що на пряму має відношення і до клітинних компонентів крові. Висока чутливість методів

дослідження всіх ланок процесу пероксидації (від субстратів до кінцевих продуктів) робить їх незамінними для моніторингу стану клітинних мембран. При тому, що збереженість клітинних компонентів є основою ефективності та безпеки застосування трансфузійного середовища.

Загальновідомо, що реакцією клітин на екстремальні впливи є активація процесів ПОЛ та порушення структури біологічних мембран зі зниженням їх бар'єрних та функціональних властивостей. Так, існують дані про зниження осмотичної стійкості заморожених еритроцитів на фоні накопичення малонового діальдегіду (МДА) - проміжного продукту ПОЛ [1].

Раніше було показано, що у клітинних суспензіях під впливом негативних факторів кріоконсервування зростає інтенсивність процесів ПОЛ [2]. Встановлено кореляцію між посиленням активності процесів пероксидацій нейтральних ліпідів і фосфоліпідів та зниженням життєздатності клітин як на підготовчих до кріоконсервування етапах, так і в розморожених клітинних компонентах крові [3]. Від ступеня інтенсифікації зазначених процесів залежать подальші можливості відновлення клітин.

Структурна організація мембран еритроцитів практично не відрізняється від інших клітин. Це складний комплекс ліпідів, білків та вуглеводів. Ліпіди мембрани відіграють визначальну роль у забезпеченні сталої структури мембрани, вибіркової її проникності для різних субстратів та іонів, регулюють активність пов'язаних з мембраною ферментів, а також беруть участь у модифікації їх вторинної структури. Тому, стан мембрани, особливо ліпідного її компоненту, має велике значення для таких характеристик як міцність чи в'язкість, а також функції життєзабезпечення клітин [4].

На жаль, найбільшою проблемою при застосуванні відмитих еритроцитів є підвищений лізис при попаданні у кровоносне русло реципієнта. Інтенсивність цього процесу залежить від стійкості їх мембран. Таким чином, моніторинг показників ПОЛ у клітинних суспензіях еритроцитів та їх зв'язків з індивідуальними характеристиками донора дозволяє здійснити об'єктивний

аналіз якості трансфузійного середовища та сприяє пошуку надійних критеріїв прогнозу та попередження надмірних втрат клітин при екстремальних впливах в процесі кріоконсервування.

Мета – визначити показники ПОЛ у еритроцитарних компонентах пуповинної крові (ПК) на етапах процесу кріоконсервування та їх залежність від деяких індивідуальних характеристик донора, а саме: статі, групової АВ0 та резус-приналежності.

Матеріали і методи дослідження. Заготівлю ПК проводили при фізіологічних пологах за умови завчасного отримання інформованої згоди вагітної. Еритроконцентрат (ЕК) отримували з цільної стабілізованої розчином ЦФДА-1 ПК з використанням методики прискореної седиментації еритроцитів [5], його використовували в якості контролю для відповідної групи зразків (К). Середовище для заморожування готували на плазмозамінюючому колоїдному розчині декстрину 40 (10%) «Реополіглюкін» (Юрія-Фарм, Україна), що містить 0,9% натрію хлориду. У якості кріопротектора застосовували диметилсульфоксид (ДМСО, Sigma, США) у кінцевій концентрації 10%. Після додавання кріоконсервуючого розчину еритроцитарну завись (ЕЗ, етап «а») розливали у кріопробірки і заморожували до температури мінус 196 °С шляхом швидкого занурення у рідку фазу азоту. Матеріал зберігали у кріопробірках об'ємом 14 мл (6-9 пробірок на 1 зразок) протягом від 1 до 5 місяців. Розморозували зразки ЕЗ на водяній бані при температурі (40 ± 2) °С. Видалення ДМСО проводили загальноприйнятим методом триразового центрифугування з використанням сольових розчинів з поступовим зниженням концентрації від гіпертонічної до ізотонічної. Після ресуспендування еритроцитів у 0,9% розчині NaCl отримували розморожену відміту еритроцитарну масу (РВЕМ - етап «в»). Вміст продуктів ПОЛ досліджували на трьох етапах (К, «а» і «в») за спектрофотометричним методом І. А. Волчегорського зі співавт. у нашій модифікації [6], який дозволяє здійснювати диференційоване визначення переокислення ацилів у структурі фосфоліпідів

(екстрагованих до ізопропанольної фази) і неетерифікованих інтермедіатів пероксидації жирних кислот нейтральних ліпідів (екстрагованих до гептанової фази). Метод вигідно відрізняється від інших тим, що в одній пробі характеризує одночасно весь спектр змін активності процесів пероксидації - за концентрацією субстратів, первинних, вторинних та кінцевих молекулярних продуктів ПОЛ. Оптичну щільність кожної фази вимірювали на спектрофотометрі Helios α (Англія) при довжині хвилі (λ) = 220 нм, що віддзеркалює концентрацію ізольованих подвійних зв'язків (ППЗ) в субстратах ПОЛ. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) вимірювали при λ = 232 нм; триєнових (ТК) – при λ = 268 нм, оксодієнових (ОДК) – при λ = 278 нм, кінцевих продуктів ПОЛ типу шифових основ (ШО) – при λ = 400 нм. Контролем були гептанова та ізопропанольна фази води. Показники ПОЛ надані в ($\bullet 10^{-9}$ Од) - після перерахунку на вміст еритроцитів у 1 мл суспензії клітин. Розподіл зразків за групами крові за системами АВ0 та резус здійснений за даними, наданими фахівцями групи імуногематології ДУ «ІГТ НАМН» (провідного наукового співробітника, канд. мед. наук, ст.н.с. Павлюк Р.П. та старшого наукового співробітника, канд. мед. наук Мироненко Г.А.). Окрім того, зразки розподіляли на 2 групи за статтю дитини. Статистичну обробку здійснювали за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel XP.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що концентрація первинних, вторинних та кінцевих продуктів ПОЛ в еритроконцентраті ПК не залежить від статі та резус-приналежності новонароджених, але є деякі відмінності між донорським матеріалом в залежності від групової АВ0 – принадлежности. Так, при пероксидації нейтральних ліпідів виявлено різницю ($p < 0,01$) вмісту кінцевих продуктів типу ШО між зразками ЕЗ з А(II) групою крові – $(0,012 \pm 0,002) \bullet 10^{-9}$ Од та В(III) – $(0,021 \pm 0,004) \bullet 10^{-9}$ Од. При пероксидації фосфоліпідів було встановлено різницю показників, що характеризують вміст проміжних продуктів, а саме: ОДК – відповідно до групової принадлежности

$(0,292 \pm 0,026) \cdot 10^{-9}$ Од та $(0,444 \pm 0,057) \cdot 10^{-9}$ Од ($p < 0,01$), а також ТК - відповідно $(0,412 \pm 0,040) \cdot 10^{-9}$ Од та $(0,640 \pm 0,089) \cdot 10^{-9}$ Од ($p < 0,05$). Показано різницю в 1,9 рази ($p < 0,05$) вмісту ІІЗ у зразках АВ(IV) групи ($(0,746 \pm 0,131) \cdot 10^{-9}$ Од) порівняно з 0(I) групою крові ($(1,425 \pm 0,233) \cdot 10^{-9}$ Од). Рівень ДК у зразках ЕЗ В(III) групи крові ($(0,555 \pm 0,080) \cdot 10^{-9}$ Од) в 1,7 рази ($p < 0,05$) перевищував значення, отримані у зразках АВ(IV) групи ($(0,324 \pm 0,069) \cdot 10^{-9}$ Од).

На етапі підготовки еритроцитів ПК до заморожування в рідкому азоті додавання кріопротектора ДМСО у кінцевій концентрації 10% призводило до збільшення ($p < 0,001$) вмісту продуктів ПОЛ у порівнянні з контролем (К), яким був концентрат еритроцитів кожної з груп (табл. 1,2). При цьому на даному етапі не знайдено достовірної між групової (АВ0) різниці показників. Після розморожування у зразках РВЕМ ПК встановлено різноспрямовані зміни показників ПОЛ порівняно з такими до заморожування (на етапі «а»), що залежало від фази екстрагованих ліпідів (нейтральних або фосфоліпідів) та продукту ПОЛ. Так, у зразках РВЕМ від донорів чоловічої статі при пероксидації нейтральних ліпідів показано зниження в 1,6 рази ($p < 0,001$) концентрації ІІЗ та в 1,5 рази ($p < 0,05$) - ДК. Показники ТК і ОДК на етапі «в», порівняно з даними, отриманими на етапі «а», мають тенденцію ($p > 0,05$) до зниження. У зразках РВЕМ від донорів жіночої статі вміст ІІЗ, ДК, ТК і ОДК також не відрізняється ($p > 0,05$) від даних, отриманих в ЕЗ до заморожування. Незалежно від статі, в зразках РВЕМ всіх донорів відмічено тенденцію до підвищення рівня ШО.

Таблиця 1 – Показники перекисного окислення ліпідів у зразках еритроконцентрату ПК при заморожуванні до температури мінус 196 °С під захистом ДМСО в кінцевій концентрації 10 % в залежності від статі та резус-приналежності дитини ($M \pm m$)

Групи зразків		Показники пероксидації нейтральних ліпідів, од. на $1 \cdot 10^{-9}$				
		ПІЗ	ДК	ТК	ОДК	ШО
I I	К	1,096±0,129	0,736±0,086	0,195±0,024	0,225±0,029	0,014±0,001
	a	3,913±0,350	2,013±0,290	0,481±0,076	0,563±0,097	0,031±0,003
	b	2,434±0,246 ₃	1,320±0,119 ₁	0,329±0,030	0,385±0,035	0,038±0,012
III	К	1,294±0,171	0,849±0,115	0,222±0,033	0,259±0,038	0,016±0,003
	a	4,423±0,547	1,923±0,162	0,452±0,043	0,532±0,060	0,034±0,005
	b	2,997±0,535	1,731±0,325	0,442±0,091	0,515±0,105	0,041±0,010
VI II	К	1,302±0,326	0,799±0,164	0,198±0,044	0,240±0,056	0,013±0,002
	a	3,938±0,737	2,564±0,946	0,604±0,252	0,798±0,356	0,029±0,005
	b	2,881±0,569	1,407±0,206 ₁	0,352±0,048 ₃	0,399±0,061 ₃	0,033±0,004 ₃
VIV	К	1,144±0,108	0,771±0,076	0,206±0,021	0,236±0,026	0,015±0,001
	a	3,490±0,331	1,560±0,139	0,372±0,035	0,421±0,040	0,029±0,003
	b	2,673±0,274	1,519±0,159	0,383±0,043	0,450±0,050	0,040±0,010
Групи зразків		Показники пероксидації фосфоліпідів, од. на $1 \cdot 10^{-9}$				
		ПІЗ	ДК	ТК	ОДК	ШО
I I	К	1,236±0,143	0,436±0,039	0,444±0,034	0,313±0,023	0,072±0,007
	a	11,213±1,060	7,903±0,557	1,294±0,154	0,925±0,107	0,183±0,019
	b	6,978±0,910 ₂	2,915±0,533 ₃	0,600±0,076 ₃	0,445±0,048 ₃	0,168±0,016
III	К	1,393±0,245	0,547±0,086	0,589±0,085	0,428±0,068	0,102±0,018
	a	14,169±2,146	9,221±1,055	1,469±0,171	1,041±0,130	0,220±0,040
	b	6,683±1,181 ₂	3,174±0,714 ₃	0,658±0,088 ₃	0,497±0,061 ₃	0,229±0,045
VI II	К	1,177±0,208	0,405±0,044	0,410±0,046	0,289±0,031	0,077±0,011
	a	11,215±2,01 ₃	7,544±1,180	1,386±0,220	1,069±0,246	0,188±0,035
	b	8,455±2,022	4,150±1,311 ₁	0,769±0,177 ₃	0,541±0,109 ₃	0,177±0,026
VIV	К	1,308±0,143	0,487±0,046	0,508±0,043	0,363±0,033	0,083±0,009
	a	11,765±1,275	7,121±0,675	1,103±0,099	0,789±0,074	0,179±0,023
	b	6,706±0,792 ₃	2,997±0,454 ₃	0,613±0,062 ₃	0,463±0,041 ₃	0,190±0,022

Примітки: К - показники у концентраті еритроцитів відповідної групи зразків; а - показники в ЕЗ після додавання кріоконсервуючого розчину; b - показники у РВЕМ; I група (n=52) - зразки еритроцитарних компонентів дитини чоловічої статі; II група (n=28) - зразки еритроцитарних компонентів дитини жіночої статі; III група (n=11) - зразки еритроцитарних компонентів від резус-негативних (Rh⁻) донорів; IV група (n=67) - зразки еритроцитарних компонентів від резус-позитивних (Rh⁺) донорів; ^{1,2,3} - вірогідна різниця показників до (a) та після (b) розморожування (відповідно p < 0,05; p < 0,01; p < 0,001).

При пероксидації фосфоліпідів у зразках РВЕМ I та II груп (розподіл за статтю) встановлено достовірне зменшення у порівнянні з показниками до заморожування концентрації ІПЗ, ДК, ТК, ОДК (у зразках від донорів - хлопчиків – відповідно в 1,6; 2,7; 2,2 і 2,1 рази, від донорів - дівчат – у 2,1; 2,9; 2,2 і 2,1). Напрямок зміни ШО є невірогідним (табл. 1). Порівняння показників ПОЛ у зразках ЕЗ зазначених груп на всіх етапах процесу кріоконсервування показало, що концентрація первинних, вторинних та кінцевих продуктів пероксидації як нейтральних ліпідів, так і фосфоліпідів не залежить від статі дитини.

Також, як до заморожування, так і після розморожування не встановлено достовірної різниці показників ПОЛ між зразками ЕЗ ПК з різною резус-приналежністю (III та IV групи зразків). Але відбувались вірогідні зміни в процесі заморожування-відтаювання в середині груп. Так, при перекисному окисленні нейтральних ліпідів у Rh⁻ зразках РВЕМ відзначено зниження (порівняно з даними до заморожування) вмісту ДК в 1,8 рази ($p < 0,05$), ТК – в 1,7 та ОДК – у 2 рази ($p < 0,001$). Концентрація ШО зростала на 14%. У той же час у групі Rh⁺ зразків достовірних відмінностей показників ПОЛ до та після розморожування не виявлено. Встановлена тенденція до зменшення у РВЕМ (відносно даних у ЕЗ до заморожування) вмісту ІПЗ, ДК і підвищення ТК, ОДК і ШО. При пероксидації фосфоліпідів у зразках РВЕМ III групи (з Rh⁻ – фенотипом) виявлено зниження концентрації ДК в 1,8 рази ($p < 0,05$), ТК – в 1,8 і ОДК – у 2 рази ($p < 0,001$). Зменшення рівня ШО не було вірогідним ($p > 0,05$), як і його підвищення у групі з Rh⁺. У зразках РВЕМ останньої групи відзначено зниження ($p < 0,001$) концентрації ІПЗ в 1,8 рази, ДК – у 2,4; ТК – у 1,8 та ОДК – у 1,7 рази (табл. 1).

Таким чином, результати дослідження свідчать, що інтенсивність ПОЛ у зразках еритроцитарних клітинних компонентів ПК, як індикатора стану мембран клітин за умови екстремального впливу факторів кріоконсервування, не залежить від статі та резус-приналежності донора.

У табл. 2 представлені дані щодо показників активності ПОЛ на етапах кріоконсервування у зразках еритроцитарних компонентів ПК, розподілених на групи крові за системою АВ0.

Таблиця 2 – Показники ПОЛ у зразках еритроцитарних компонентів ПК на етапах процесу кріоконсервування в залежності від групи крові дитини за системою АВ0 (M±m)

Групи зразків		Показники пероксидації нейтральних ліпідів, од. на $1 \cdot 10^{-9}$				
		ПЗ	ДК	ТК	ОДК	ШО
II	К	1,164±0,173	0,762±0,109	0,206±0,032	0,224±0,035	0,016±0,002
	a	4,673±0,603 3	2,373±0,420 3	0,575±0,109 2	0,674±0,145 2	0,035±0,005 3
	b	2,135±0,255 2,6	1,261±0,144 2,4	0,324±0,038 1,4	0,373±0,044 2,4	0,027±0,003 2
III	К	1,076±0,129	0,713±0,087	0,186±0,024	0,213±0,029	0,012±0,002
	a	3,439±0,270 3	1,538±0,173 3	0,357±0,049 2	0,427±0,067 2	0,027±0,003 3
	b	3,284±0,466 3	1,613±0,208 3	0,395±0,049 3	0,468±0,065 3	0,059±0,025 3
III V	К	1,429±0,259	0,954±0,166	0,247±0,043	0,294±0,057	0,021±0,004
	a	4,429±0,629 3	1,966±0,221 3	0,449±0,053 3	0,546±0,085 3	0,040±0,005 3
	b	3,181±0,947 2	1,953±0,609 3	0,498±0,175 3	0,575±0,195 3	0,042±0,019 3
VI V	К	0,817±0,110	0,545±0,075	0,152±0,022	0,166±0,023	0,008±0,001
	a	3,674±0,669 3	2,172±0,528 3	0,551±0,134 3	0,574±0,129 3	0,020±0,004 3
	b	1,345±0,099 3,6	0,780±0,053 3,6	0,196±0,015 3,6	0,251±0,019 3,6	0,021±0,003 3,6
Групи зразків		Показники пероксидації фосфоліпідів, од. на $1 \cdot 10^{-9}$				
		ПЗ	ДК	ТК	ОДК	ШО
II	К	1,425±0,233	0,519±0,083	0,535±0,075	0,390±0,061	0,086±0,014
	a	12,448±1,859 3	9,171±1,004 3	1,596±0,269 3	1,150±0,192 3	0,217±0,041 2
	b	5,664±0,867 3,5	2,327±0,536 3,6	0,554±0,085 6	0,411±0,053 6	0,158±0,020 2
III	К	1,176±0,152	0,427±0,039	0,412±0,040	0,292±0,026	0,076±0,011
	a	11,751±1,607 3	7,626±0,679 3	1,130±0,095 3	0,802±0,064 3	0,194±0,023 3
	b	10,195±1,822 3	4,289±1,014 3,5	0,763±0,129 3,4	0,562±0,083 3,4	0,220±0,030 3

III V	К	1,489±0,411	0,555±0,080	0,640±0,089	0,444±0,057	0,106±0,027
	a	15,218±2,647 3	10,263±1,031 3	1,466±0,198 3	1,048±0,138 3	0,199±0,028 3
	b	5,245±0,849 3,5	3,422±0,995 3,6	0,685±0,134 6	0,521±0,095 2,6	0,226±0,081 3,4
V IV	К	0,746±0,071	0,324±0,036	0,375±0,010	0,261±0,036	0,061±0,010
	a	8,561±1,690 3	4,230±0,540 3	0,859±0,083 3	0,600±0,066 3	0,119±0,030 3
	b	3,766±1,013 3,5	0,755±0,095 3,6	0,322±0,046 3,6	0,251±0,031 6	0,145±0,022 3,6

Примітки: К - показники у концентраті еритроцитів відповідної групи зразків тів; а – показники в ЕЗ після додавання кріоконсервуючого розчину; b – показники у РВЕМ; I група (n=32) – зразки еритроцитарних компонентів 0(I) групи крові; II група (n=24) – зразки еритроцитарних компонентів А(II) групи крові; III група (n=14) – зразки еритроцитарних компонентів В(III) групи крові; IV група (n=11) – зразки еритроцитарних компонентів АВ(IV) групи крові; ^{1,2,3} – вірогідна різниця показників до (а) та після(б) розморожування у порівнянні з групою К (відповідно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$); ^{4,5,6} - вірогідна різниця показників до (а) та після(б) розморожування (відповідно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$).

Встановлено, що додавання до ЕЗ кріопротектора ДМСО у кінцевій концентрації 10% призводило до вірогідного збільшення вмісту продуктів ПОЛ у порівнянні з контролем. Показники пероксидації нейтральних ліпідів в залежності від групової приналежності крові та продукту ПОЛ зростали в 1,1 – 4,5 рази. Найбільш істотно зростала концентрація продуктів перекисного окислення фосфоліпідів. Так, ШЗ збільшувалась у 8,7 – 11,5 разів, у той час, коли концентрація ДК піднімалась у 13,1 - 18,5 разів. Рівень ТК, ОДК та ШО зростав у 1,9 - 3,0 рази в залежності від групи крові.

Знайдено достовірну міжгрупову різницю показників на етапі «а». Так, при пероксидації нейтральних ліпідів вміст ШО у зразках ЕЗ В(III) групи крові перевищував такий в А(II) групі в 1,5 рази ($p < 0,05$), у зразках з АВ(IV) – в 1,75 рази був знижений ($p < 0,05$) у порівнянні з 0(I) групою та у 2 рази ($p < 0,001$) – із зразками В(III) групи. Достовірно ($p < 0,01$) в 1,2 рази відрізнявся рівень ДК у зразках ЕЗ АВ(IV) і В(III) груп. При перекисному окисленні фосфоліпідів на етапі додавання кріопротектора до ЕЗ рівень ДК у III групі, порівняно з II, перевищував у 1,4 рази ($p < 0,05$). Встановлено перевищення вмісту у зразках 0(I) групи крові відносно АВ(IV) на етапі «а» наступних показників: ДК (у 2,2

рази, $p < 0,001$), ТК (в 1,9 рази, $p < 0,01$), ОДК (у 1,9 рази, $p < 0,01$). У зразках А(II) рівень ДК перевищував такий АВ(IV) групи в 1,8 рази ($p < 0,001$), тоді як показники ТК, ОДК – в 1,3 ($p < 0,05$) і ШО – в 1,6 рази ($p < 0,05$). Дані зразків В(III) групи на етапі «а» також були вищими за аналогічні у АВ(IV): ДК – у 2,4 рази, ТК, ОДК і ШО – в 1,7 рази ($p < 0,001$).

Після розморожування найнижчий вміст продуктів ПОЛ (етап «б») також був відмічений у зразках ЕЗ з АВ(IV) групою крові. Наприклад, при перекисному окисленні нейтральних ліпідів у РВЕМ рівень ІПЗ зразків з АВ(IV) групою крові був нижчим у 1,6 рази ($p < 0,01$) порівняно зі зразками 0(I) - приналежності та у 2,4 рази ($p < 0,001$) - відносно зразків А(II) та В(III) груп крові. Але цей показник у зразках з А(II) групою перевищував його у 1,5 рази ($p < 0,05$). Також нижчою, порівняно зі зразками інших груп крові (0(I), А(II) і В(III)), виявились і концентрації: ДК - відповідно в 1,6 ($p < 0,01$), у 2,1 та у 2,5 рази ($p < 0,001$); ТК – відповідно в 1,6 ($p < 0,01$); у 2,0 та у 2,5 рази ($p < 0,001$); ОДК – відповідно в 1,5 ($p < 0,05$); у 1,9 ($p < 0,01$) та у 2,3 рази ($p < 0,001$). Вміст ШО був нижчим у 2 рази ($p < 0,001$) порівняно тільки зі зразками В(III) групи крові.

При пероксидації фосфоліпідів відносно зразків 0(I) встановлено перевищення в 1,8 рази ($p < 0,05$) рівня ІПЗ у РВЕМ А(II) групи крові та його нижчий рівень у зразках В(III) групи (у 1,9 рази, $p < 0,05$). Цей показник був також нижчим у зразках з АВ(IV) групою у порівнянні зі зразками А(II) групи крові у 2,7 рази ($p < 0,01$). Вміст ДК у РВЕМ АВ(IV) групи був меншим порівняно зі зразками 0(I), А(II) та В(III) груп крові відповідно у 3,1 рази ($p < 0,01$), у 5,6 разів та у 4,5 рази ($p < 0,001$). У зразках АВ(IV) групи спостерігались значно менші рівні таких показників як ТК відповідно групам: 0(I) - в 1,7 рази ($p < 0,05$), А(II) - у 2,4 ($p < 0,01$) та В(III) - у 2,1 рази ($p < 0,001$); ОДК – відповідно в 1,6 ($p < 0,01$); 2,2 та 2,1рази ($p < 0,001$). Концентрація ШО була меншою у порівнянні з РВЕМ як А(II) групи крові (в 1,5 рази ($p < 0,05$)), так і В(III) групи (в 1,6 рази ($p < 0,001$)). Також при

перекисному окисленні як нейтральних ліпідів, так і фосфоліпідів встановлено вірогідне зниження у розморожених зразках 0(I) та АВ(IV) групи крові у порівнянні з даними до заморожування (етап «а») вмісту ПЗ, ДК, ТК і ОДК. Концентрація ШО достовірно зростала у РВЕМ АВ(IV) групи крові, а також у розморожених зразках В(III) групи. В останніх збільшення відбувалось тільки при пероксидації фосфоліпідів (табл. 2).

Таким чином, результати дослідження ПОЛ свідчать, що найменш чутливими до негативних чинників кріоконсервування є еритроцити АВ(IV) групи крові. Показники перекисного окислення нейтральних ліпідів та фосфоліпідів у РВЕМ цієї групи є вірогідно нижчими порівняно з усіма іншими групами зразків при розподілі за АВ0 груповою приналежністю.

Причинно-наслідкові зв'язки порушення функції мембрани еритроцита необхідно розглядати з точки зору комплексного аналізу. Окрім бар'єрної та транспортної функції мембрана еритроцита виконує також і рецепторну, що пов'язана з численними ланками обміну речовин, миттєвими клітинними реакціями загального та високо специфічного характеру, в тому числі і тих, що визначають резистентність клітин до зовнішніх впливів [7]. Рецепторна функція еритроцита здійснюється у тому числі і за рахунок структур, що є одночасно антигенами видової, групової та індивідуальної специфічності. Тому, генетичний поліморфізм антигенів груп крові, взаємозв'язки біологічних властивостей та структурно-функціональних характеристик, їх можливий вплив на стійкість до зовнішніх чинників дає підстави для пошуку зв'язків з резистентністю або, навпаки, чутливістю до дії фізико-хімічних факторів в процесі заморожування-відтаювання.

Висновки

Встановлено наявність вірогідної різниці показників перекисного окислення як нейтральних ліпідів, так і фосфоліпідів на всіх етапах технологічного процесу кріоконсервування у групах зразків, що мають різну АВ0 групову приналежність. Найбільш стійкими до негативних факторів

кріоконсервування за показниками ПОЛ є еритроцити АВ(IV) групи крові. Показано, що активність процесів перекисного окислення ліпідів в суспензіях еритроцитів ПК не залежить від статі та резус-приналежності донора.

Отже, результати дослідження ПОЛ у еритроцитарних компонентах ПК свідчать про існування певних зв'язків між окремими індивідуальними характеристиками фенотипу донора, до яких відноситься і АВ0-групова приналежність крові, та збереженістю мембран еритроцитів при екстремальних впливах.

Література

1. Свойства эритроцитов, замороженных в среде с декстраном, диметилсульфоксидом и глюкозой / Рамазанов В. В., Воловельская Е. Л., Коптелов В. А., Бондаренко В. А. // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 3, Т.1, №94. – С. 241-245.

2. Аношина М. Ю. Характеристика процесів перекисного окислення ліпідів у зразках пуповинної крові на етапах кріоконсервування / М. Ю. Аношина, Т. О. Калиниченко // Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. – Київ, „Атіка – Н”, 2010. – Вип. 35. – С.139-147.

3. Окисний гомеостаз та збереженість гемопоетичної тканини пуповинної крові на етапах процесу кріоконсервування трансплантаційного матеріалу / Т. О. Калиниченко, М. Ю. Аношина, В. В. Балан [та ін.] // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л.Шупика. – Київ, 2012. – Вип. 21, книга 3. – С.111-116.

4. Чеснокова Н. П. Лекция 2. Особенности структуры и функции эритроцитарной мембраны / Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. // Успехи современного естествознания. – 2015. - № 1-2. – С. 328-331.

5. Патент на корисну модель № 21507 UA А01N1/00, 1/02, АК35/14 Спосіб підготовки ядровмісних клітин пуповинної крові до кріоконсервування / (Перехрестенко П. М., Глухенька Г. Т., Калиниченко Т. О.) – № 2006 10727; заявл. 10.10.2006; опубл. 15.03.2007. // Бюл. № 3.

6. Аношина М. Ю. Оцінка перекисного окислення ліпідів у зразках кріоконсервованої пуповинної крові / М. Ю. Аношина, Т. О. Калиниченко, Г. Т. Глухенька // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2011. - №3. – С. 12-15.

7. Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium vivax / P. A. Zimmerman, M. U. Ferreira, R. E. Howes, O. Mercereau-Puijalon // Adv Parasitol. Author manuscript; available in PMC 2013 Jul 31. – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3728992/>

Надійшла 25.09.2017 року.

УДК 616.155.392.2 – 036.12-085

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ІМУННИХ УСКЛАДНЕНЬ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ

О. Я. Виговська

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Резюме. Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) може ускладнюватись імунними цитопеніями. Серед обстежених нами 34 хворих на ХЛЛ, найчастішою формою цитопенії була автоімунна гемолітична анемія (АГА) (22 хворих), рідше спостерігалась імунна тромбоцитопенія (ІТП) (6 хворих) та синдром Фішер-Івенса (4 хворих). У однієї хворої виявили парціальну червоноклітинну аплазію (ПЧА), і ще у однієї хворої, імунну нейтропенію (ІН). Автоімунна гемолітична анемія у 2 хворих розвинулась під час лікування лейкераном, у 2 пацієнтів після курсу СОР (циклофосфан, вінкристин, преднізолон) і у одного хворого після курсу ФС (флударабін, циклофосфан). Синдром Фішер-Івенса у одного хворого розвинувся під час лікування лейкераном. Із прогностичних маркерів перебігу ХЛЛ у всіх хворих виявлялись високі показники CD38 та β 2-мікроглобуліну (β 2-МГ). Генетичні маркери визначали у 12 хворих. У 2 хворих виявили del (11q) і ще у 2 хворих del (11q) в комбінації з del (17p). Згідно даних літератури, така асоціація спостерігається у 1% хворих на ХЛЛ і розцінюється як прогностично дуже несприятлива. Найкращі результати лікування були отримані при застосуванні схем з ритуксимабом.

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, автоімунні ускладнення, автоімунна гемолітична анемія, імунна тромбоцитопенія, імунна нейтропенія, лікування.

THE PECULIARITIES OF IMMUNE COMPLICATIONS OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

O. Vygovska

SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine", Lviv

Summary: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) may be complicated by immune cytopenia. Among the 34 surveyed our patients with CLL, the most common form of autoimmune cytopenia

was autoimmune hemolytic anemia (AIHA) (22 patients), with a lower frequency of immune thrombocytopenia (ITP) (6 patients) and Fisher-Evans syndrome (4 patients). One patient had pure red blood cell aplasia (PRBCA), and one patient had autoimmune neutropenia (AIN). Autoimmune hemolytic anemia developed in 2 patients treated with leukeran, in 2 patients after treatment COP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone), and in one patient after treatment FC (fludarabine, cyclophosphamide). Fisher-Evans syndrome developed in one patient during treatment with leukeran. Among prognostic markers of CLL in all patients revealed high rates of CD38 and the β 2-microglobulin (β 2-MG). Genetic markers were determined in 12 patients. 2 patients we revealed with del (11q), and 2 patients with del (11q) in combination with del (17p). According to the literature, this association occurs in 1% of patients with CLL and is regarded prognostically very unfavorable. The best results were obtained by treatment in the in combination with rituximab.

Keywords: *chronic lymphocytic leukemia, autoimmune complications, autoimmune hemolytic anemia, immune thrombocytopenia, autoimmune neutropenia, treatment.*

Вступ. Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) доволі часто ускладнюється імунними цитопеніями (ІЦ). Це імунна гемолітична анемія (АІГА), імунна тромбоцитопенія (ІТП), або комбінація гемолізу та тромбоцитопенії – синдром Фішер-Івенса. Рідкісними ускладненнями є імунна нейтропенія (ІН) та парціальна червоноклітинна аплазія (ПЧА). Ці ускладнення слід диференціювати з цитопеніями іншого генезу, зокрема недостатністю кістковомозкового кровотворення (метаплазія кісткового мозку лейкемічними лімфоцитами, пригнічення функції кісткового мозку хіміопрепаратами) [2, 9].

Імунні цитопенії можуть виникати на різних стадіях ХЛЛ, суттєво впливають на перебіг хвороби та вимагають особливих підходів до лікування. [6, 9, 20].

Метою даного дослідження було визначення особливостей перебігу імунних цитопеній у хворих на ХЛЛ, в залежності від форми цитопенії, часу виникнення ускладнення, проведення лікування.

Матеріали і методи дослідження. Під нашим спостереженням знаходилось 34 хворих на ХЛЛ, ускладнену імунними цитопеніями. Серед них: 18 чоловіків у віці 54-78 років та 16 жінок у віці 49-76 років.

Найчастішою формою імунної цитопенії була імунна гемолітична анемія (22 хворих) (III ст. Rai), рідше спостерігалась імунна тромбоцитопенія (6 хворих) (IV ст. Rai). Синдром Фішер-Івенса виник у 4 хворих (IV ст. Rai),

імунна нейтропенія у 1 хворої (II ст. Rai), та парціальна червоноклітинна аплазія у 1 хворої (III ст. Rai).

Діагноз ХЛЛ у всіх хворих підтверджений імунофенотипуванням. У всіх хворих у периферичній крові виявилась В-клітинна популяція CD5⁺, CD 19⁺, CD 20⁺, CD23⁺.

Діагноз імунної гемолітичної анемії встановлювали на основі швидкого наростання анемії, іктеричності склер та шкіри, непрямой білірубінемії, позитивного тесту Кумбса, ретикулоцитозу, збереженого еритроцитарного паростка гемопоезу в стернальному пунктаті. Імунну тромбоцитопенію встановлювали при наявності у хворого геморагічного синдрому, тромбоцитопенії у периферичній крові при збереженні показників червоної крові та достатньої кількості мегакаріоцитів у стернальному пунктаті. Для синдрому Фішер-Івенса притаманні комбінації синдромів гемолізу та тромбоцитопенії при наявності в стернальному пунктаті збережених червоного та мегакаріоцитарного паростків.

Результати дослідження. Розподіл хворих за віком, статтю та формою імунної цитопенії представлений в табл. 1.

Враховуючи особливості перебігу і, особливо, лікування хворих похилого віку, ми розділили їх на дві групи: < 65 років та > 65 років (табл.1). Як видно з даних таблиці гемолітична анемія та синдром Фішер-Івенса з однаковою частотою спостерігались серед жінок та чоловіків різних вікових груп. Імунна тромбоцитопенія частіше виникала у чоловіків молодшої групи (< 65 років).

Таблиця 1 – Розподіл хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію за формою імунної цитопенії, статтю та віком

Імунна цитопенія	Чоловіки		Жінки		Разом
	< 65років	>65років	<65років	>65років	
Гемолітична	6	5	4	7	22

анемія					
Тромбоцитопенія	4	1	0	1	6
С-м Фішер-Івенса	1	1	1	1	4
Нейтропенія	0	0	1	0	1
Червоноклітинна аплазія	0	0	0	1	1
	11	7	6	10	34

В табл. 2 представлений час виникнення гемолітичної анемії в залежності від дати діагностування ХЛЛ.

Імунна гемолітична анемія частіше виникала на ранніх стадіях ХЛЛ у чоловіків. Так у 3-х хворих гемоліз виник як дебют хвороби, у 5 чоловіків впродовж року від діагностування ХЛЛ, і тільки у 2 хворих на 5-му чи пізніше році хвороби. Серед жінок, тільки у однієї хворої ХЛЛ дебютувала гемолізом. У переважній більшості (6 хворих) гемоліз розвинувся на 5 році хвороби та пізніше.

Таблиця 2 – Час виникнення автоімунної гемолітичної анемії в залежності від дати діагностування хронічної лімфоцитарної лейкемії

Час до виникнення АІГА	Чоловіки	Жінки
Дебют	3	1
До 12 місяців	5	0
До 24 місяців	1	1
До 36 місяців	0	2
До 48 місяців	0	1
До 60 місяців	1	3
>60 місяців	1	3

Імунна тромбоцитопенія у всіх хворих (5 чоловіків, 1 жінка) була першим проявом хвороби. Геморагічний синдром, тромбоцитопенія були причиною для

обстеження хворих, що і дозволило встановити ХЛЛ. Синдром Фішер-Івенса у 2-х хворих виник на ранніх стадіях хвороби і у 2-х хворих на пізніх стадіях. Червоноклітинна аплазія діагностована у жінки 72 роки на 31 місяці від дати діагностики ХЛЛ. Імунна нейтропенія виникла на 156 місяці хвороби у хворої, ХЛЛ у якої діагностовано у 40 років.

В табл. 3 представлені показники периферичної крові у хворих з різними формами імунних цитопеній. У всіх хворих спостерігалось збільшення числа лейкоцитів, високий лімфоцитоз .

Таблиця 3 – Показники периферичної крові у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, ускладнену імунними цитопеніями

Форма ускладнення	Гемоглобін (г/л) Медіана, Нижній- верхній квартиль	Еритроцити ($\times 10^{12}/л$) Медіана, Нижній- верхній квартиль	Лейкоцити ($\times 10^9/л$) Медіана, Нижній- верхній квартиль	Лімфоцити (%) Медіана , Нижній - верхній квартиль	Тромбоцити ($\times 10^9/л$) Медіана, Нижній- верхній квартиль	Ретикулоцити (%) Медіана , Нижній- верхній квартиль	Білірубін мкмоль/ л Медіана, Нижній- верхній квартиль
АІГА	67,5 [53-88,5]	2,02 [1,5-2,7]	107 [44,5- 157]	87 [75,5- 90,5]	193 [146- 236]	67 [52-127]	42 [37-72]
ІТП	134 [125-146]	4,7 [4,4-4,9]	55 [34-61]	82,5 [74-84]	34,5 [15-65]		
С-м Фіше р- Івенса	49,5 [37-68]	1,45 [1,15- 2,1]	155 [101,5- 209]	95,5 [90- 97,5]	45 [17,5-76]	44 [29-54]	60 [26-86]

У хворих з тромбоцитопенією число лейкоцитів було менше у порівнянні з двома іншими групами, хоча відсоток лімфоцитів був майже однаковий.

При ускладненні АІГА виявлено низький вміст гемоглобіну та еритроцитів, ретикулоцитоз, непряму білірубінемію при нормальній кількості тромбоцитів. У хворих з ІТП кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну коливались в межах норми. Кількість тромбоцитів була суттєво знижена. У хворих з синдромом Фішер-Івенса показники червоної крові та число тромбоцитів суттєво знижені. У 21 хворого з АІГА виявились теплові антитіла (позитивний прямиий тест Кумбса). У однієї хворої спостерігався високий титр холодних антитіл (1:8000).

Прогностичні маркери перебігу ХЛЛ досліджували під час імунного ускладнення (табл. 4). Так, рівень CD 38⁺ клітин у всіх хворих був високий, за виключенням двох хворих з АІГА (2% та 25% відповідно). У хворих з синдромом Фішер-Івенса вміст CD 38⁺ клітин становив 28-83%.

Таблиця 4 – Прогностичні маркери перебігу хронічної лімфоцитарної лейкемії у хворих з імунними ускладненнями

Форма ускладнення	β₂-МГ (мг/л) Медіана, Нижній-верхній квартиль	CD38 (%) Медіана, Нижній-верхній квартиль
АІГА	4,53 [3,44-5,2]	64,5 [55-69,5]
ІТП	4,64 [3,8-51]	63 [61-71]

Як видно з даних таблиці 4, рівень β₂-МГ у хворих з АІГА та ІТП був значно вище нормальних показників, за винятком 2-х хворих з АІГА, у яких рівень β₂-МГ становив 1,69 мг/мл та 2,65 мг/мл.

При ускладненні синдромом Фішер-Івенса, вміст β_2 -МГ коливався від 6,8 мг/мл до 7,7 мг/мл.

У 12 хворих досліджувались генетичні маркери прогнозування перебігу ХЛЛ. У 2-х хворих з АІГА виявлено del (11q) (у 11% та 100% клітин в окремих хворих). У 2-х хворих з ІТП виявлено одночасно del (11q) та del (17p) (18% та 15% клітин відповідно у одного хворого та 16% та 29% клітин відповідно у другого хворого). У одного хворого del (13q) в 73% клітин.

Як видно з табл. 2, у 4 хворих АІГА була першим проявом ХЛЛ. Ще у 2-х хворих (чоловіки) діагноз ХЛЛ встановлено на II та III стадіях хвороби, у зв'язку з чим хворим призначено курс хіміотерапії за схемою COP (циклофосфан, вінкрисин, преднізолон). Після курсу почався гемоліз, тобто розвиток АІГА був зв'язаний з проведеним лікуванням. Ще у 2-х хворих гемоліз розвинувся на фоні лікування лейкераном. Серед хворих, у яких гемоліз розвинувся через тривалий час від діагностування ХЛЛ, 9 хворих лікування не отримували, 7 пацієнтів отримували короткі курси лейкерану, ще 2 хворих - курсову терапію COP в різний час до розвитку гемолізу. Виникнення АІГА не було пов'язане з проводимим лікуванням.

При розвитку АІГА, 5 хворих отримували лікування стероїдними гормонами + лейкеран з нетривалими ремісіями. 4 хворим проводилось лікування за схемою COP і 3 хворим за схемою CNOP (циклофосфан, вінкрисин, доксорубіцин, преднізолон). У 2 хворих після курсів COP спостерігались ремісії, одна хвора померла через рік від початку гемолізу, ще у одного хворого ефекту від лікування не було, хворий помер. Схема CNOP виявилась ефективною у одного хворого. Ще у одного хворого, при періодичному застосуванні схеми CNOP, рецидивування гемолізу тривало 2 роки, після того хворий помер. Одна хвора виявилась повністю резистентна до лікування CNOP і, при виникненні гострого гемолізу, померла на 58 місяці від діагностування ХЛЛ.

11 хворим, при виникненні гемолізу, застосовувались схеми з включенням ритуксимабу: R-COP (ритуксимаб, циклофосфан, вінкрестин, преднізолон) та R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфан, вінкрестин, доксорубіцин, преднізолон). У 9 хворих після 4-6 курсів R-COP чи R-CHOP спостерігались тривалі ремісії. Тільки один хворий виявився резистентний до лікування (R-CHOP) і помер. У однієї хворої з наявністю холодкових антитіл, після 4 курсів R-CHOP спостерігалась короткотривала ремісія. Надалі, хворій проводився плазмаферез і 4-разове введення ритуксимабу з інтервалами в тиждень, після чого настала ремісія, що триває (14 місяців до написання статті).

У одного хворого, після 6 курсів R-CHOP настала тривала ремісія. Гемолізу не було 32 місяці. Однак, у зв'язку з прогресуванням ХЛЛ (наростання лейкоцитозу, збільшення розмірів лімфатичних вузлів, печінки та селезінки), хворому проведено 3 курси R-FC (ритуксимаб, флударабін, циклофосфан), після чого почався важкий гемоліз, що не піддавався лікуванню R-CHOP і, у свою чергу, став причиною смерті хворого. Слід відзначити, що у даного хворого виявили делецію $del(11q)$ у 100% проаналізованих клітин.

У зв'язку з тим, що імунна тромбоцитопенія була першим проявом ХЛЛ, лікування хворим проводилось з перших днів діагностування хвороби. Одному хворому проводилась монотерапія преднізолоном з частковим ефектом. Ще один хворий отримував лікування за схемою COP, пізніше курси бендамустину (у цього хворого виявлена $del(17p)$ у 15% клітин та $del(11q)$ у 18% клітин. Інша хвора отримувала лікування лейкеран + преднізолон та курси FCP (флударабін, циклофосфан, преднізолон). В обох хворих зменшилось число лімфоцитів, зменшились розміри лімфатичних вузлів, однак кількість тромбоцитів вище $99 \cdot 10^9/л$ та $85 \cdot 10^9/л$ (відповідно) не піднімалась. Двом хворим проводилась монотерапія ритуксимабом (чотири введення R в дозі 375 мг/м^2 з інтервалом в тиждень). У обох хворих зросло число тромбоцитів до $128 \cdot 10^9/л$ та $145 \cdot 10^9/л$ і утримується впродовж 19 місяців. Один хворий отримав 6 курсів R-COP з підтримуючою терапією ритуксимабом раз в 3

місяці впродовж року. Повна клініко-гематологічна ремісія в нього утримується вже 33 місяці, незважаючи на наявність $\text{del}(17p)$ у 29% клітин та $\text{del}(11q)$ у 16% клітин.

Ускладнення перебігу ХЛЛ – синдром Фішер-Івенса спостерігали у 4 хворих. У одного із них, гемоліз і тромбоцитопенія розвинулись гостро на фоні прийому лейкерану. На лікування стероїдними гормонами ефекту не було. Хворий помер через місяць від розвитку синдрому Фішер-Івенса. При генетичному дослідженні у цього хворого виявлено $\text{del}(13q)$ у 73% клітин. Двом хворим проводилось лікування за схемою СНОР з короткочасним ефектом. Одна хвора отримала лікування за схемою R-COP, в результаті чого настала ремісія. Генетичних мутацій у цієї хворої не виявлено.

У однієї хворої через 31 місяць від діагностики ХЛЛ, розвинулась червоноклітинна аплазія (кількість лейкоцитів у периферичній крові $12 \cdot 10^9/\text{л}$, лімфоцитів – 73%, в стернальному пунктаті лімфоцитів – 31%, еритрокаріоцитів – 3,2%). Хворій проводилась терапія стероїдними гормонами та трансфузія концентрату еритроцитів. Імунну нейтропенію ми спостерігали у хворої на 156 місяці від діагностики ХЛЛ. Попередньо хвора отримала 4 курси R-FC. Зниження числа лейкоцитів до $1,4 \cdot 10^9/\text{л}$ спостерігалось через 6 місяців після закінчення останнього курсу. Ліквідацію ускладнення вдалось добитись призначенням стероїдних гормонів і стимуляторів гранулоцитопоезу.

Серед 18 хворих з «раннім» (до року) виникненням імунного ускладнення, 3 хворих померли через 6 - 38 місяців від діагностики ХЛЛ. Інші 15 знаходяться під нашим спостереженням від 16 до 98 місяців.

Із 16 хворих з «пізнім» ускладненням імунною цитопенією, 4 померли на 58 – 72 місяці від діагностики ХЛЛ. 12 хворих заходяться під нашим спостереженням від 36 до 170 місяців від початку захворювання.

На рисунках 1, 2, 3 представлені криві виживання обстежених нами хворих.

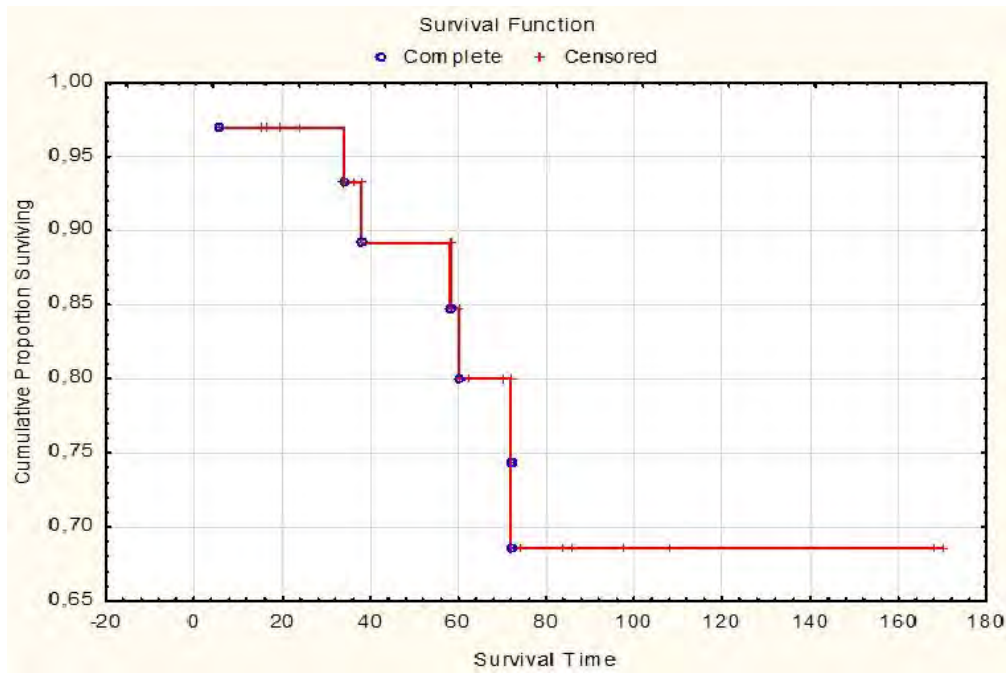


Рис. 1. Криві виживання хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, ускладнену імунними цитопеніями.

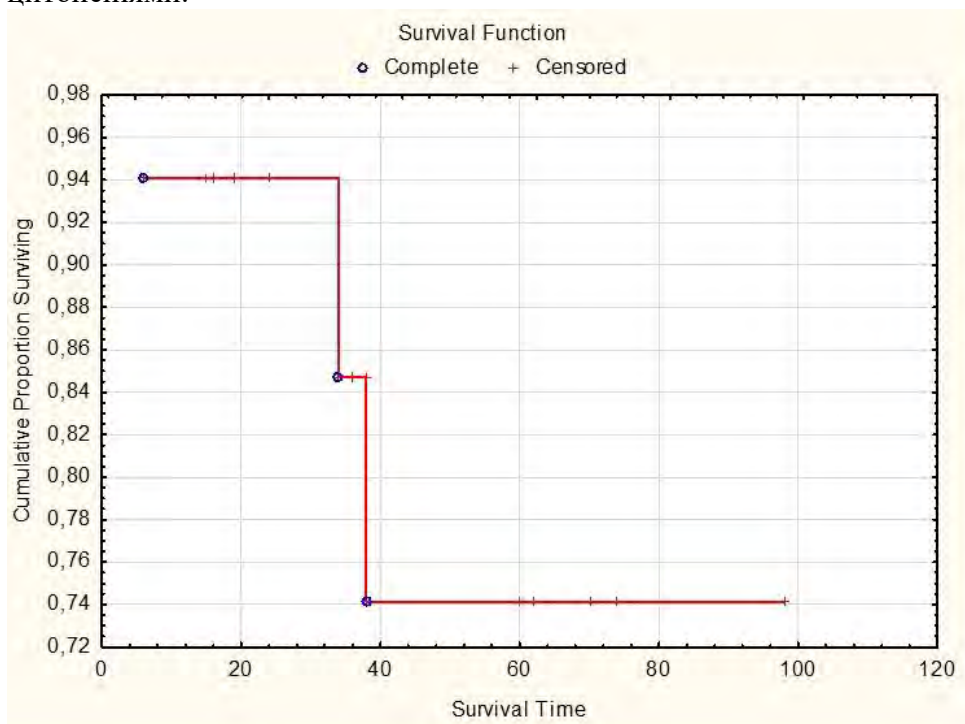


Рис. 2. Криві виживання хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, імунна цитопенія у яких розвинулась на ранніх стадіях хвороби (до 12 місяців).

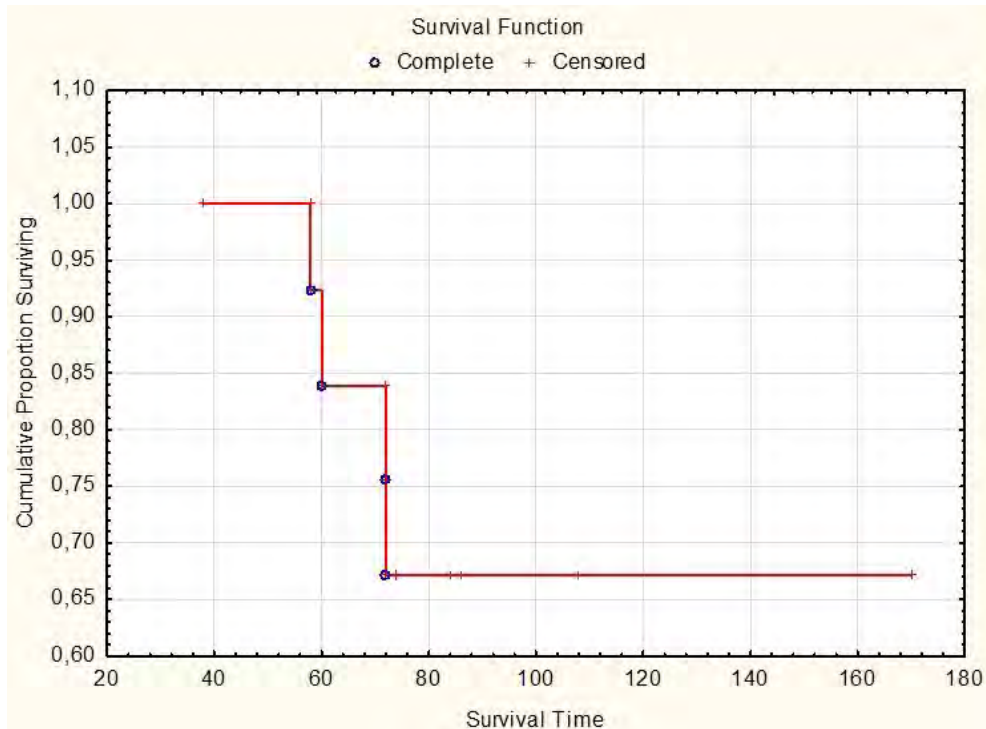


Рис. 3. Криві виживання хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, імунна цитопенія у яких розвинулась на пізніх стадіях хвороби.

Обговорення. Частота імунних ускладнень у хворих на ХЛЛ, згідно даних різних авторів, коливається від 4,3% до 9,7% [8, 9, 23]. Найчастішим імунним ускладненням є гемолітична анемія – 5-10% хворих [23], 7% хворих [8]. Рідше спостерігається ІТП: 1-5% [15, 23]. Рідкісними ускладненнями є: імунна нейтропенія та парціальна червоноклітинна аплазія – 1% хворих [6, 7]. Згідно даних С. Zent і N. Kay [23], серед усіх форм ІЦ, у 50-60% хворих спостерігається комбінація гемолізу і тромбоцитопенії – синдром Фішер-Івенса.

Серед обстежених нами хворих, найбільш частою формою також була АІГА (22 хворих), однак синдром Фішер-Івенса ми спостерігали тільки у 4 хворих, що не співпадає з даними С. Zent і спів. [23].

Імунні цитопенії слід диференціювати з цитопеніями іншого генезу, зокрема, недостатністю кістковомозкового кровотворення. Так, під час спостереження за 1750 хворими на ХЛЛ, впродовж 10 років, в клініці Mayo, цитопенія не зумовлена прийомом цитостатиків, встановлена у 24% хворих. Серед них, у 54% хворих діагностовано ураження кісткового мозку, у 18%

виявлені імунні цитопенії, у 11% хворих цитопенія не була пов'язана з ХЛЛ, у 4% пацієнтів розцінена як ускладнення тривалого лікування, і у 3% як наслідок гіперспленізму [20]. Згідно даних літератури, прогноз хворих з ІЦ кращий, ніж з метастатичними. Згідно даних А. Gaman [12], медіана виживання хворих з ІТП становить 5,7 років, а з метастатичною тромбоцитопенією, – 2,8 років. Суттєве значення має час виникнення імунного ускладнення. Так, хворі у яких ІЦ виникла на ранніх стадіях ХЛЛ мають коротше виживання, ніж аналогічні хворі без імунних ускладнень [6, 11]. Однак, хворі з пізніми клінічними стадіями ХЛЛ з ІЦ мають краще виживання, ніж хворі з цитопенією, зумовленою ураженням кістковомозкового кровотворення [2, 9]. Серед обстежених нами хворих ІЦ частіше розвивалась на ранніх стадіях ХЛЛ (18 хворих).

Відомо, що АІГА зумовлена наявністю антиеритроцитарних антитіл теплових класу IgG, що виявляються за допомогою прямого антиглобулінового тесту Кумбса [19]. Серед обстежених нами хворих з АІГА, прямий тест Кумбса був позитивний у 21 хворого, тобто гемоліз у цих хворих був зумовлений наявністю теплових антитіл. У однієї хворої виявлені холододі аглютиніни у дуже високому титрі (1:8000), тобто гемоліз був зумовлений холододі антитілами. Згідно даних літератури, антитіла, що викликають ІТП у хворих на ХЛЛ, - поліклональні, високоафінні IgG, спрямовані проти поверхневого антигену тромбоцитів GРІІb [23]. Визначати ці антитіла в наших умовах не було можливості.

У значній кількості повідомлень, виникнення ІЦ пов'язують з прийомом алкілюючих препаратів [11]. С. Moreno і спів. [5], у 5% хворих на ХЛЛ, які лікувались хлорабуцилом, спостерігали імунні ускладнення. Значно частіше виникнення ІЦ пов'язують з прийомом аналогів пуринових нуклеозидів. Внаслідок лікування флударабіном, розвиток ІЦ спостерігали у 11% хворих [19]. Рідше ІЦ спостерігалась після курсової терапії флударабін+ циклофосфан – 5% [19], і тільки у 1% хворих при застосуванні схеми R-FC (ритуксимаб,

флударабін, циклофосфан) [4]. Описаний випадок виникнення АІГА у 70-річної жінки після лікування бендамустином [13]. Т. Rider і спів. [17] описали гострий гемоліз у хворі на ХЛЛ через 4 тижні від початку лікування ібрутинібом.

Серед обстежених нами хворих, важкий гемоліз розвинувся у двох хворих після лікування лейкераном і у двох хворих безпосередньо після курсу СОР (циклофосфан, вінкрестин, преднізолон). У одного із цих хворих гемоліз був ліквідований курсовою терапією R-СНОР. При прогресуванні хвороби (без гемолізу) хворому призначено схему FC, після чого розвинувся гострий гемоліз, що не піддавався терапії, хворий помер. Ще у одного хворого під час лікування лейкераном розвинувся синдром Фішер-Івенса. Слід відзначити, що у цього хворого була виявлена del (11q) у 100% клітин. Дані літератури і наші спостереження свідчать, що у частини хворих на ХЛЛ виникнення ІЦ може бути пов'язане з прийомом різних цитостатичних середників, однак у більшості хворих причину виникнення ІЦ встановити не вдалось. А. Gaman і спів. [12] повідомляють, що частіше ІЦ спостерігається у хворих старшого віку, чоловічої статі, при високому лейкоцитозі та немутованому IGHV. У низці повідомлень також відзначають частіше виникнення ІЦ у хворих з немутованим IGHV [4, 6, 9, 15, 20]. Крім того, як несприятливі маркери щодо виникнення ІЦ відзначають наявність del (11q), високі показники ZAP70, CD38, β_2 -МГ [4, 6, 8, 20]. У обстежених нами хворих також спостерігались високі показники CD38 та β_2 -МГ.

Серед обстежених нами хворих, генетичні маркери прогнозування перебігу ХЛЛ визначились у 12 хворих. У 2 хворих виявили del (11q) і ще у 2 хворих – del (11q) та del (17p). Згідно даних літератури del (11q) спостерігається у 20% хворих на ХЛЛ [12], а у обстежених нами хворих del (11q) виявлена у 1/3 хворих, тобто значно частіше ніж у хворих на ХЛЛ без імунних ускладнень.

Слід відзначити, що у 2 хворих del (11q) виявлялась одночасно з del (17p), що згідно даних літератури, є рідкісним та характеризує особливо несприятливий прогноз. Так, Р. Greipp і спів. [16], при визначенні генетичних

маркерів у 2184 хворих на ХЛЛ, del (17p) виявили у 7% хворих, del (11q) – у 11% хворих, асоціацію del (17p) та del (11q) тільки у 1% хворих. Середня тривалість життя цієї групи хворих була найкоротшою (1,9 років), в той час як у хворих з del (17p) – 3,1 років, а з del (11q) – 4,8 років. Спостереження за виявленими нами хворими продовжується.

Відомо, що перша лінія лікування при виникненні ІЦ – стероїдні гормони. Тривала відповідь на стероїдні гормони спостерігається у 1/3 хворих [23], 52% хворих [15]. При рецидивах рекомендують імунодепресанти, зокрема циклоспорин А [10]. Короткотривалий ефект спостерігається при застосуванні імуноглобулінів для в/в введення [23].

Відзначається також ефективність комбінованої хіміотерапії: при застосуванні схеми COP повна ремісія ІЦ середньою тривалістю 13,5 міс. спостерігалась у 75% хворих [1].

Останнім часом доведена ефективність ритуксимабу (R) при ускладнених ХЛЛ імунними цитопеніями [9, 12].

Більшої ефективності досягають при комбінації R з хіміопрепаратами – схема R-CD (ритуксимаб, циклофосфан, дексаметазон) [3], R-COP [21]. При резистентних формах – алемтузумаб – антиCD52 [22]. Описано випадок ефективності ібрутинібу при резистентній АІГА до преднізолону і схеми COP [14]. У хворих із суттєвим збільшенням селезінки, при резистентності до терапевтичних методів лікування, рекомендують спленектомію [18].

Спостереження над 233 спленектомованими хворими на ХЛЛ, ускладнену ІТП впродовж 10 років показало, що 88% хворих відповіли на спленектомію [18].

Застосування стероїдних гормонів як першої лінії лікування, серед обстежених нами хворих призводило, як правило, до короткотривалої ремісії, імунного ускладнення. Більш ефективним було лікування за схемами COP чи CNOP. Ремісії спостерігались частіше, тривалість їх була більшою, однак 4 хворих із цієї групи померли в період ІЦ на 5-6 році від діагностики ХЛЛ. 11

хворим проведено лікування за схемою R-COP чи R-CHOP. Тільки один хворий виявився резистентний до такої терапії та помер через 2 роки від діагностики ХЛЛ. У всіх інших настала тривала ремісія. Однак, у одного із цих хворих через 32 міс. настав рецидив ХЛЛ без гемолізу, у зв'язку з чим, призначено схему R-FC. На таке лікування швидко розвинувся рецидив гемолізу, який не піддавався лікуванню. Хворий помер.

Добрі результати ми спостерігали при застосуванні ритуксимабу як монотерапії у 2 хворих на ІТП та однієї хворої на АІГА, зумовлену холодowymi аглютинінами. Після 4-ох введень ритуксимабу з тижневими інтервалами, ремісія у цих хворих триває 14-19 міс. (на час оформлення статті).

Як відомо, в загальноприйнятих класифікаціях ХЛЛ, анемія і тромбоцитопенія без встановлення їх причини, є основою для діагностики пізніх стадій ХЛЛ (III, IV Rai та C за Binet), однак ІЦ на противагу метапластичним краще піддаються лікуванню і суттєво не впливають на тривалість життя [6, 20].

Дані літератури та наші спостереження свідчать, що включення ритуксимабу в схеми лікування ІЦ у хворих на ХЛЛ, значно покращило прогноз хвороби. Коли ІЦ виникла на ранніх стадіях хвороби і у хворого немає лімфаденопатії, збільшення селезінки, невисокий лімфоцитоз, збережений в кістковому мозку червоний та мегакаріцитарний паростки, оптимальним заходом є монотерапія ритуксимабом в дозі 375 мг/кг маси – 4 введення з тижневим інтервалом. При наявності збільшення лімфатичних вузлів, селезінки, значному лімфоцитозі у разі виникнення ІЦ, найбільш доцільним є застосування схем R-COP чи R-CHOP у залежності від віку хворого.

Висновки

1. Найчастішою формою імунної цитопенії у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію є імунна гемолітична анемія. У 2 хворих автоімунна гемолітична анемія розвинулась в процесі лікування лейкераном, у 2 хворих після курсу хіміотерапії за схемою COP і у одного хворого після курсу FC.

2. Автоімунна гемолітична анемія з однаковою частотою спостерігається серед чоловіків та жінок різних вікових груп.

3. Автоімунна гемолітична анемія і, особливо, імунна тромбоцитопенія частіше виникають у чоловіків на ранніх стадіях хронічної лімфоцитарної лейкемії.

4. У 32 хворих спостерігались високі показники CD38 та β 2-мікроглобуліну.

5. Серед 12 хворих, яким визначались генетичні маркери прогнозу, у двох хворих виявлено del (11q) і ще у 2 хворих del (11q) та del (17p). Така асоціація є рідкісною (1% хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію) і особливо несприятливою.

6. Найкращі результати лікування отримані при застосуванні схем, що включали ритуксимаб.

Література

1. Імунні ускладнення хронічної лімфоїдної лейкемії: порівняльна характеристика клінічної ефективності та змін імунофенотипу в процесі терапії преднізолоном та комбінації вінкрестину з преднізолоном / Я. І. Виговська, В. О. Логінський, Ю. С. Кароль [та ін.] // Онкологія. – 2000. – № 2. – С. 260-263.

2. Прогностичне значення характеру цитопенії у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію / Я. І. Виговська, В. О. Логінський, Ю. С. Кароль [та ін.] // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2002. – № 6 (2). – С. 5-11.

3. A combination of rituximab, cyclophosphamide and dexamethasone effectively treats immune cytopenias of chronic lymphocytic leukemia / M. Kaufman, S. A. Limaye, N. Driscoll [et al.] // Leuk. Lymphoma. – 2009. – Vol. 50(6). – P. 892-899.

4. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia: diagnosis and treatment / K. Hodgson, G. Ferrer, A. Pereira [et al.] // Br. J. Haematol. – 2011. – Vol. 154(1). – P. 14-22.

5. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance / C. Moreno, K. Hodgson, G. Ferrer [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116 (23). – P. 4771-4776.

6. Autoimmune Hemolytic Anemia In Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated With IgVH Status / C. Visco, E. Novella, E. Peotta [et al.] // *Haematologica*. – 2010. – Vol. 95. – P. 1230-1232.

7. Autoimmune neutropenia following therapy for chronic lymphocytic leukaemia: a report of three cases / L. Roberts, G. Lucas, L. Green [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2007. – Vol. 136(2). – P. 348-349.

8. Hodgson K. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review / K. Hodgson, G. Ferrer, E. Montserrat // *Haematologica*. – 2011. – Vol. 96(5). – P. 752-761.

9. Chronic lymphocytic leukemia-associated immune thrombocytopenia treated with rituximab: a retrospective study of 21 patients / G. D'Arena, S. Capalbo, L. Laurenti [et al.] // *European Journal of Haematology*. – 2010. – Vol. 85(6). – P. 502-507.

10. Cyclosporin A for the treatment of cytopenia associated with chronic lymphocytic leukemia / J. Cortes, S. O'Brien, J. Loscertales [et al.] // *Cancer*. – 2001. – Vol. 92(8). – P. 2016-2022.

11. Dearden, C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia / C. Dearden // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. – 2008. – P. 450-456

12. Gaman, A. M. Immune Thrombocytopenia in Chronic Lymphocytic Leukemia / A. M. Gaman, M. A. Gaman // *Journal of Blood Disorders & Transfusion*. – 2014. – Vol. 5. – P. 198.

13. Haddad H. Bendamustine-induced immune hemolytic anemia in a chronic lymphocytic leukemia patient: A case report and review of the literature / H. Haddad, F. Mohammad, Q. Dai // *Hematol. Oncol. Stem. Cell. Ther.* – 2014. – Vol. 7(4). – P. 162-164.

14. Ibrutinib is an effective treatment of autoimmune haemolytic anaemia in chronic lymphocytic leukaemia / S. Manda, N. Dunbar, C. Marx-Wood [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2015. 170(5). – P. 734-736.

15. Impact of immune thrombocytopenia on the clinical course of chronic lymphocytic leukemia / C. Visco, M. Ruggeri, M. L. Evangelista [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111(3). – P. 1110-1116.

16. Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis / P. T. Greipp, S. A. Smoley, D. S. Viswanatha [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 163(3). – P. 326-333.

17. Rider T. Autoimmune haemolytic anaemia occurring during ibrutinib therapy for chronic lymphocytic leukaemia / T. Rider, R. Grace, J. Newman // *British Journal of Haematology*. – 2016. – Vol. 173(2). – P. 326-327.

18. Splenectomy as a curative treatment for immune thrombocytopenia: a retrospective analysis of 233 patients with a minimum follow up of 10 years / N. Vianelli, F. Palandri, N. Polverelli [et al.] // *Haematologica*. – 2013. – Vol. 98(6). – P. 875-880.

19. The prognostic significance of a positive direct antiglobulin test in chronic lymphocytic leukemia: a beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of hemolytic anemia / C. Dearden, R. Wade, M. Else [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111(4). – P. 1820-1826.

20. The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma / C. S. Zent, W. Ding, S. M. Schwager [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2008. – Vol. 141. – P. 615-621.

21. Treatment of autoimmune cytopenia complicating progressive chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone / D. A. Bowen D.A., T. G. Call, T. D. Shanafelt [et al.] // *Leuk. Lymphoma*. – 2010. – Vol. 51(4). – P. 620-627.

22. Treatment of severe refractory autoimmune hemolytic anemia in B-cell chronic lymphocytic leukemia with alemtuzumab (humanized CD52 monoclonal antibody)

/ C. Karlsson, L. Hansson, F. Celsing [et al.] // Leukemia. – 2007. – Vol. 21(3). – P. 511- 514.

23. Zent C. S. Autoimmune Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) / C. S. Zent, N. E. Kay // Best Pract. Res. Clin. Haematol. – 2010. – Vol. 23(1). P. 47-59.

Надійшла 24.10.2017 року.

УДК 577 213/.216: 577.213/.215

ВИЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЇ V617F ГЕНА JAK2 ПРИ ХРОНІЧНИХ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

М.І. Вороняк, М.В. Кокоруз, І.М. Юрчишак, С.П. Міляшкевич

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

***Резюме.** В роботі обґрунтована доцільність діагностування мутації V617F гена JAK2 при підозрі на хронічні мієлопроліферативні захворювання та проаналізовано результати обстеження 123 хворих на наявність даної мутації.*

***Ключові слова:** мієлопроліферативні захворювання, мутація V617F, ген JAK2, алель, гетерозигота, гомозигота.*

DETERMINATION OF V617F JAK2 MUTATION IN CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

M.I. Vroniak, M.V. Kokoruz, I.M. Yurchyshak, S.P. Mylyashkevich

SI “Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine”, Lviv

***Resume.** The expediency of diagnosing the V617F mutation of the JAK2 gene in suspected chronic myeloproliferative diseases are reasonable in this article and the results of a survey of 123 patients with the presence of this mutation are analyzed.*

***Key words:** myeloproliferative disorders, V617F mutation, JAK2 gene, allele, heterozygote, homozygote.*

Хронічні мієлопроліферативні захворювання (ХМПЗ) - група неоплазій (гемобластозів), при яких спостерігається вибіркова, або, частіше, множинна гіперплазія гемопоетичних клітин кісткового мозку, результатом чого є надмірне продукування зрілих клітин еритроїдного, мегакаріоцитарного та гранулоцитарного паростків. Захворювання характеризуються відносно тривалим перебігом. Загальні характеристики, які об'єднують ці хвороби,

включають гіперклітинність кісткового мозку, схильність до тромбозів і геморагій, ризик лейкозної трансформації та розвиток фіброзу в процесі еволюції хвороби. Як правило, ці порушення не успадковуються, хоча й зустрічаються сім'ї, в яких кілька членів мають ці розлади.

До основних розладів в даній групі відносять хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), істинну поліцитемію (ІП), есенціальну тромбоцитемію (ЕТ) та ідіопатичний або первинний мієлофіброз (ПМФ). ХМЛ є злоякісною пухлиною кровотворної тканини, що бере основу з клітин-попередниць мієлопоезу. При даній патології виникає надмірне утворення гранулоцитів. Властива характерна цитогенетична особливість - транслокація 9 і 22 хромосом, з утворенням аномального злитого гена BCR-ABL. Дана аномалія отримала назву "філадельфійська хромосома" або Ph⁺. Так як в інших захворюваннях даної групи ця мутація не виявлена, то їх називають Ph⁻ негативними мієлопроліферативними захворюваннями (Ph⁻).

Останні роки ознаменувалися фундаментальними успіхами в розумінні патогенезу Ph⁻-ХМПЗ. В 2005 році була виявлена специфічна для цих захворювань молекулярна аномалія – набута точкова мутація V617F гена Янускінази 2 (JAK2 V617F) [4]. Ген JAK2 розташований в короткому плечі хромосоми 9 і складається з 25 екзонів, а його білок містить 1132 амінокислоти. Точкова мутація V617F являє собою заміну гуаніну на тимін у положенні 1849 екзону 14, в результаті чого синтезується білок, в якому замість валіну присутній фенілаланін, що приводить до підвищеної кіназної активності. Внаслідок цього відбувається посилена неконтрольована проліферація клітин крові еритроїдного, мегакаріоцитарного та гранулоцитарного паростків, у результаті чого і виникають ХМПЗ.

Відкриття мутації JAK2 V617F привело до перегляду діагностичних критеріїв, критеріїв відповіді на проведену терапію, а також стало стимулом для створення нового класу таргетних препаратів – низькомолекулярних інгібіторів янус-кіназ, які показали хорошу ефективність і безпеку в клінічних

дослідженнях [2, 4, 5, 7, 8, 10]. З кожним роком молекулярно-генетичні методи все ширше впроваджуються в клінічну практику як для вдосконалення діагностичних критеріїв, так і для контролю ефективності лікування. І хоча молекулярно-генетичні тести в більшості випадків не самодостатні, проте вони значно прискорюють встановлення діагнозу та підвищують його достовірність.

За допомогою сучасних молекулярно-генетичних методів (алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), піросеквенування, кількісна ПЛР в реальному часі, метод високороздільного плавлення) вдалося визначити частоту виявлення мутації JAK2 V617F при різних ХМПЗ. Дана мутація була виявлена у більшості пацієнтів з ПП - 95 – 97 %, у 50 -70 % пацієнтів з ЕТ і 40 – 65 % - з ПМФ [1, 2, 3, 6,11, 13].

З 2008 року до основних діагностичних критеріїв ХМПЗ був включений такий критерій, як наявність мутації JAK2 V617F. Дослідження мутацій JAK2 стали стандартним методом діагностики ХМПЗ [2, 3, 8, 11, 12] і використовуються для моніторингу ефективності терапії. Присутність мутації JAK2 V617F або інших мутацій JAK2, включаючи мутації в екзоні 12, тепер використовують у онкогематології як головні критерії для постановки діагнозу ХМПЗ.

Метою роботи стало якісне виявлення мутації JAK2 V617F у пацієнтів з підозрою на ХМПЗ.

Матеріали і методи. Забір венозної крові проводився в вакуумні пробірки з K₂ ЕДТА ємністю 3 мл. Виділення ДНК проводилось з крові об'ємом 1 мл у двох повторах для кожного пацієнта за допомогою реактиву «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» фірми «Литех». У випадку необхідності довготривалого зберігання отримане ДНК заморожували в морозильнику при – 20 °С. Визначення мутації V617F гена JAK2 проводили методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу постановкою мультиплексної реакції. Використовували набори реактивів для виявлення

поліморфізмів у геномі людини методом ПЦР «SNP-ЭКСПРЕСС-SHOT» (Single nucleotide polymorphism- однонуклеотидний поліморфізм). Алель 1 («дикого типу») маркувалась флюорофором HEX, алель 2 (мутована) визначалася по каналу FAM. Ампліфікація проводилась на приладі CFX96™ Real-Time System виробництва фірми Bio-Rad (США). Кожен зразок ДНК хворого досліджувався у двох повторах і для уникнення хибнопозитивних чи хибнонегативних результатів під час кожної ампліфікації ставили негативний контроль та 3 позитивні контролю. Зчитування результатів проводилось за допомогою програми CFX Manager™ Software 3,0. Результати аналізу дозволяють дати три типи заключень: гомозигота за нормальною алелю 1; гетерозигота (одночасно алель1 + алель2) і гомозигота по патологічній алелі 2. Аналіз здійснювали за кривими накопичення флюоресцентного сигналу від кожного зразка. Для гетерозиготного зразка різниця циклів виходу кривих накопичення флюоресцентного продукту з нормальним і мутантом варіантом повинна бути не більше 1,5.

Результати та їх обговорення. Наявність мутації JAK2 V617F визначалось у 123 хворих з підозрою на ХМПЗ віком від 21 до 76 років, з яких 51 жінка і 72 чоловіки. Мутацію виявили у 51 пацієнта, з них 27 жінок та 24 чоловіки. Серед пацієнтів з виявленою мутацією було 34 – з гетерозиготою, а 17 – з гомозиготою. Дані результати були використані в подальшому при діагностуванні та лікуванні.

Мутація V617F гена JAK2 стала ключовим молекулярним маркером у діагностиці Ph⁻-ХМПЗ. Так як з 2008 року мутацію JAK2 V617F включено в список основних діагностичних критеріїв ХМПЗ, тому рекомендовано проводити якісне визначення мутації JAK2 V617F під час первинного обстеження пацієнтів з підозрюються на ХМПЗ, а для моніторингу лікування доцільно здійснювати кількісне визначення мутантного гена.

Висновок

JAK2 V617F є соматичною мутацією, що виникає в гемопоетичних клітинах-попередниках. Вона зустрічається у переважної більшості хворих на ХМПЗ, що робить цю мутацію дуже зручним діагностичним маркером. Наявність точкової мутації у положенні 1849 G / T (617 V / F) - феномен, характерний виключно для ураження мієлоїдного паростка, і не описаний для солідних пухлин, ні для пухлин лімфоїдного походження. Зараз молекулярне дослідження входить в діагностичні критерії ВООЗ, а тест на наявність мутації JAK2 став стандартним методом діагностики ХМПЗ. Виявлення мутації вказує на наявність клонального ХМПЗ і виключає можливість реактивного еритроцитозу, тромбоцитозу або мієлофіброзу. В даний час дослідження на наявність мутації JAK2 V617F необхідна умова для встановлення правильного діагнозу і визначення подальшої тактики лікування пацієнта.

Література

1. Клименко С. В. Діагностика справжньої поліцитемії, есенціальної тромбоцитемії та ідіопатичного мієлофіброзу. / Клименко С. В., Костюкевич О. М., Шолойко В.В. // Збірка довідкових матеріалів. – Київ, 2013. – 15 с.
2. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Rh-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз). // Материалы II конгресса гематологов России. – 2014. – 81с.
3. Материалы 19-го конгресса Европейской гематологической ассоциации (2014 г., Милан). Подгот. Меликян А. Л. и Суборцева И. Н. // Клин. онкогематол. – 2014. – № 7(4) – с. 599–608.
4. Меликян А. Л. Биология миелопролиферативных новообразований. / Меликян А. Л., Суборцева И. Н. // Клиническая онкогематология. – 2016. – № 9(3). – с. 314–325.

5. Мисюрин А. В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний./ Мисюрин А. В. // Клиническая онкогематология. – 2009. – Т. 2, №3. – С. 211-219.
6. Саврилова А. М. Выявление мутации JAK2 V617F при хронических Ph-негативных заболеваниях. / Саврилова А. М., Костерина А. В., Ахмадеев А. Р. // Генетика, Практическая медицина 04 (14) Инновационные технологии в медицине. Том 1. Электронный ресурс <http://mfvt.ru/vyyavlenie-mutacii-JAK2-v617f-pri-xronicheskix-ph-negativnyx-zabolevaniyah/>
7. Соколова М. А. Современные представления о «классических» Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях / Соколова М. А. // Клиническая онкогематология. – 2010. – Т. 3. №3. – С. 235-242.
8. Cervantes F. JAK inhibitors: beyond spleen and symptoms? / Cervantes F., Mesa R., Harrison C. // Haematologica. – 2013. – 98(2). – P. 160-162.
9. Hobbs G. S. JAK2 Mutations and JAK Inhibitors in the Management of Myeloproliferative Neoplasms. / Hobbs G. S., Rampal R. K. // Электронный ресурс: [//www.onclive.com/publications/contemporary-oncology/2015/february-2015/JAK2-mutations-and-JAK-inhibitors-in-the-management-of-myeloproliferative-neoplasms/1#sthash.2uUQKkED.dpuf](http://www.onclive.com/publications/contemporary-oncology/2015/february-2015/JAK2-mutations-and-JAK-inhibitors-in-the-management-of-myeloproliferative-neoplasms/1#sthash.2uUQKkED.dpuf)
10. Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. / Jovanovic J. V., Ivey A., Vannucchi A. M. [et al.] / Leukemia. – 2013. – 27(10). – P. 2032-2039.
11. Muxí P. J. JAK-2 positive myeloproliferative neoplasms. / Muxí P. J., Oliver A. C. // Curr Treat Options Oncol. – 2014. – 15(2). – P.147-156.
12. McPherson S. Epigenetics in Myeloproliferative Neoplasms / McPherson S., McMullin M. F., Ken Mills K. // J. Cell. Mol. Med. – 2017. – Vol. 21, № 9. – P. 1660-1667.

13. Nielsen C. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. / Nielsen C., Bojesen S. E., Nordestgaard B. G., [et al] // Haematologica. – 2014. – 99(9). – P. 1448 – 1455.

Надійшла 30.10.2017 року.

УДК 616.155.392

ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ІМУНІТЕТУ ПРИ В-КЛІТИННІЙ ХРОНІЧНІЙ ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ

А. І. Гордієнко, Н. М.Третяк, В. О. Кубарова, Г. С. Стародуб, Г. А. Бортнік

ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України", Київ

Резюме. Метою роботи було вивчення стану клітинного імунітету у хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (В-ХЛЛ) з різним ступенем вираженості пухлинного процесу.

Матеріали і методи. Мононуклеари периферичної крові (МПК) фарбували в прямому двокольоровому імунофлюоресцентному тесті моноклональними антитілами (МКА) фірми Becton Dickinson. Антигенний профіль МПК вивчали на проточному лазерному цитофлюориметрі FACScan (Becton Dickinson, USA за допомогою програмного забезпечення LYSYS-II Ver. 1.1 (Becton Dickinson), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) і Microsoft Excel 2000 з пакета Microsoft Office 2000.

Результати. У 20 хворих на В-ХЛЛ був проаналізований стан клітинного імунітету. Показано, що ступінь вираженості Т-клітинного дефіциту залежить від кількості в периферичній крові пухлинних клітин з фенотиповими ознаками CD19⁺CD5⁺. Така ж закономірність відмічена і у відношенні зниження в крові кількості CD16⁺CD56⁺ та CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клітин, що здійснюють протипухлинний імунний нагляд.

Висновки. Отримані дані можуть бути використані для розробки нових підходів до імунотерапії у хворих на В-ХЛЛ.

Ключові слова: В-клітинний хронічний лімфолейкоз, клітинний імунітет, CD антигени, проточна цитофлюориметрія.

CHANGES IN INDICATORS OF IMMUNITY IN B-CELLULAR CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

A. Gordienko, N. Tretyak, V. Kubarova, G. Starodub, G. Bortník

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. The aim of the study was to study the state of cellular immunity in patients with B-cellular chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) with varying degrees of tumor process.

Materials and methods Peripheral blood mononuclear cells (PBM) were stained in a direct two-color immunofluorescence test with monoclonal antibodies (MCA) from Becton Dickinson. The antigenic profile of the PBM was studied on a FACScan flow-through laser cytofluorometer (Becton Dickinson, USA using the LYSYS-II Ver.1.1 software (Becton Dickinson), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) and Microsoft Excel 2000 from the Microsoft package Office 2000.

Results. The 20 patients with B-CCL leukemia analyze cells immunity status. Showing, that degree expression T-cells deficiency dependent from quantity malignant cells $CD19^+CD5^+$ in peripheral blood. The same regularity observe as regards to fall number $CD16^+CD56^+$ and $CD3^+CD16^+CD56^+$ cells, which realized antileukemia immunity supervision, in blood.

Conclusions. Facts, that was receive, it is possible use for work up new approaches to immunotherapy patients with B-cells chronic leukemia.

Key words: B-cells chronic leukemia, cells immunity, CD antigens, flow cytometry.

Вступ. В-клітинна хронічна лімфоцитарна лейкемія (В-ХЛЛ) відноситься до лімфопроліферативних захворювань з повільною клональною експансією злякисних та імунологічно незрілих $CD19^+$ В-лімфоцитів, що коекспресують антиген $CD5^+$. Наявність цих клітин є важливим диференційно-діагностичним маркером даного захворювання [1, 2]. Пухлинний процес у хворих на В-ХЛЛ протікає на тлі значних змін з боку клітинно-опосередкованого і гуморального імунітету. Незважаючи на наявні дані про зміни в системі імунітету у хворих на В-ХЛЛ, механізми, що беруть участь в цьому, залишаються недостатньо вивченими. Тому актуальним є дослідження клітинно-молекулярних механізмів, що впливають на розвиток порушень імунітету у хворих на В-ХЛЛ. Це необхідно для оцінки ролі імунних дисфункцій у патогенезі В-ХЛЛ і розуміння біологічних особливостей захворювання. Крім того, інформація про механізми, що призводять до суттєвих зрушень в системі імунітету у хворих на В-ХЛЛ, може бути використана в якості теоретичної основи для розробки принципово нових підходів до імунотерапії хворих на В-ХЛЛ.

Метою даної роботи було вивчення стану клітинного імунітету хворих на В-ХЛЛ з різним ступенем вираженості пухлинного процесу.

Матеріали та методи дослідження. Імунологічне обстеження проведено 20 хворим (серед них 4 жінки і 16 чоловіків) у віці від 49 до 75 років з вперше встановленим діагнозом В-ХЛЛ. Відповідно до класифікації по Rai обстежені пацієнти перебували на II-III стадіях захворювання.

Для імунофенотипового дослідження мононуклеари периферичної крові (МПК) фарбували в прямому двокольоровому імунофлюоресцентному тесті відповідними моноклональними антитілами (МКА) фірми Becton Dickinson, міченими флюоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) і фікоеритрином (PE). Для контролю рівня неспецифічного зв'язування кон'югатів МКА зразки крові фарбували мишачими МКА проти гемоціаніну фіссурелли (Keyhole limpet) субкласів IgG1 IgG2a, що мічені FITC і PE відповідно [3]. Антигенний профіль МПК вивчали на проточному лазерному цитофлюориметрії FACScan (Becton Dickinson, USA). Збір даних проводили за допомогою програмного забезпечення LYSYS-II Ver. 1.1 (Becton Dickinson), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) і Microsoft Excel 2000 з пакету Microsoft Office 2000. При статистичній обробці даних використовували пакет програм Statsoft STATICA 6.0. Наявність кореляції між показниками, що досліджуються, оцінювали за допомогою непараметричного критерію Спірмена. Параметри імунітету у хворих на В-ХЛЛ порівнювали з аналогічними показниками для контрольної групи практично здорових осіб (20 чоловік).

Результати та їх обговорення. Отримані результати про стан адаптивного (набутого специфічного) імунітету, а також особливості розподілу в ПК природних кілерних клітин (ПКК, фенотип CD16⁺CD56⁺) і антигеннеспецифічних HLA-DR-нерестриктованих Т-кілерів (ТКК, фенотип CD⁺CD16⁺CD56⁺) підсумовані в таблиці; там же наведені відомості про нормативні значення показників контрольної групи.

Таблиця – **Фенотип клітин периферичної крові хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію і практично здорових осіб контрольної групи (відсоток позитивних і пухлинних клітин/M±m)**

CD-антигени	I група хворих на В-ХЛЛ (n=13)	II група хворих на В-ХЛЛ (n=7)	Контрольна група (n=20)
CD45 ⁺	97,8±0,5*	94,8±1,7*	95,0±1,2

CD3 ⁺	19,2±2,6*	2,1±0,4*	65,6±3,3
CD4 ⁺	9,3±1,5*	1,2±0,3*	44,6±2,7
CD8 ⁺	10,0±1,3*	1,6±0,2*	37,8±2,8
Співвідношення CD4/CD8	1,0±0,1*	0,9±0,4*	1,3±0,1
CD4 ⁺ CD8 ⁺	0,5±0,2*	0,3±0,1*	0,6±0,1
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	3,4±0,8*	0,3±0,1*	14,8±1,4
CD16 ⁺ CD56 ⁺	1,8±0,3*	0,6±0,1*	20,4±2,2
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	1,3±0,5*	0,3±0,1*	6,0±0,4
CD19 ⁺ CD5 ⁺	88,1±3,4*	96,9±0,7*	17,0±1,8

Примітки: * – вірогідно порівняно з показниками у здорових осіб (p<0,05).

Абсолютне число лімфоцитів в ПК і показники Т-системи імунітету, що варіюють, у обстежених пацієнтів з В-ХЛЛ послужили підставою для виділення двох груп хворих, в рамках яких потім розглядалися досліджувані параметри. В першу групу (n = 13) увійшли хворі з більш високими показниками імунітету, а в другу групу (n = 7) – з більш низькими.

В основному популяція лімфоцитів ПК хворих першої групи представлена пухлинними клітинами з фенотиповими ознаками CD19⁺CD5⁺. За даними гемограм абсолютна кількість лімфоцитів у хворих цієї групи становила 70,9±49,9 · 10⁹/л. Як випливає з даних таблиці, популяція Т-загальних лімфоцитів (CD3⁺-клітини) зменшена в 3,4 рази в порівнянні з нормативними значеннями (p<0,05). Результати імунофенотипових досліджень свідчать про те, що у цих же хворих число CD4⁺- і CD8⁺-лімфоцитів нижче, ніж у донорів відповідно в 4,8 і 3,8 рази (p<0,05). У хворих на В-ХЛЛ на відміну від осіб контрольної групи спостерігався кількісний перерозподіл субпопуляційного складу Т-лімфоцитів в бік збільшення числа CD8⁺-клітин. Співвідношення імунорегуляторних субпопуляцій (CD4/CD8) в середньому було в 1,3 рази (p<0,05) менше контрольних значень. Кількість незрілих Т-лімфоцитів, що

експресують одночасно антигени CD4 і CD8, вкладалася в діапазон коливань норми (не більше 1%). Аналіз імунограм обстежених хворих на В-ХЛЛ показав, що вміст в ПК активованих Т-лімфоцитів з фенотипом CD3⁺HLA-DR⁺ нижче норми в 4,4 рази. У всіх випадках спостерігалася низька щільність експресії молекули HLA-DR⁺ на CD3⁺-лімфоцитах. На підставі даних цитофлюориметричних досліджень встановлено, що в першій групі хворих відносний вміст CD16⁺CD56⁺-лімфоцитів і CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лімфоцитів знижено відповідно в 11,3 і 4,6 рази в порівнянні з такими ж показниками у осіб контрольної групи (p<0,05). У обстежених хворих вивчено вплив клону пухлинних клітин (імунофенотип CD19⁺CD5⁺) на імунокомпетентні лімфоцити. Виявлено зворотно кореляційну залежність між кількістю пухлинних клітин і числом CD3⁺ (r = -0,65; p <0,05), CD4⁺ (r = -0,70; p <0,05), CD3⁺HLA-DR⁺ (r = -0,84; p<0,05), CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (r = - 0,71; p<0,05) лімфоцитів.

Отримані результати свідчать, що в другій групі пацієнтів кількість CD19⁺CD5⁺-пухлинних клітин в ПК незначно (в 1,1 рази) перевищувала аналогічний показник у хворих першої групи. У цих хворих абсолютне число лімфоцитів в крові становило $225,3 \pm 82,5 \cdot 10^9 / \text{л}$. Оцінка імунофенотипу лімфоцитів ПК показала, що у хворих другої групи значно сильніше виражені зміни в Т-системі імунітету (табл.). Так, число CD3⁺-лімфоцитів виявилось істотно (в 31,2 рази) зниженим у порівнянні з контрольними значеннями (p<0,05). Зміни також стосувалися CD4⁺- і CD8⁺-імунорегуляторних субпопуляцій; їх число було зменшено щодо норми відповідно в 37,2 і 23,6 рази (p<0,05). Інверсія імунорегуляторного індексу, що спостерігалась в цих випадках, підтверджувала наявний дисбаланс в Т-системі імунітету хворих на В-ХЛЛ. До цього ж треба додати, що CD3⁺-лімфоцити слабо експресували активаційний маркер антиген HLA-DR. Крім того, відхилення в Т-системі імунітету у хворих другої групи супроводжувалися зниженням в ПК числа CD16⁺CD56⁺- і CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лімфоцитів відповідно в 34,0 і 20,0 разів (p<0,05). Результати кореляційного аналізу показали, що у хворих цієї групи

існує зворотна залежність між числом пухлинних клітин (CD19⁺CD5⁺-лімфоцити) і кількістю CD3⁺CD16⁺CD56⁺-клітин ($r = -0,81$; $p < 0,05$). У всіх обстежених пацієнтів першої та другої груп лімфоцити ПК були позитивні на антиген CD45, експресія якого нерідко перевищувала 95%, але відрізнялася низькою інтенсивністю флюоресценції.

Отже, імунологічний аналіз показав, що в обох групах у пацієнтів з В-ХЛЛ спостерігалися істотні порушення в Т-системі імунітету. Вони характеризувалися значним зниженням кількості CD3⁺-лімфоцитів, а також CD4⁺, CD8⁺ імунорегуляторних субпопуляцій. Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які показали, що у хворих на В-ХЛЛ поряд зі зменшенням числа Т-лімфоцитів в периферичній циркуляції, відбувається зниження їх функціональної активності. Можливо, що реальною причиною функціонального дисбалансу Т-клітин у хворих на В-ХЛЛ можуть бути порушення в Т-клітинному рецепторному комплексі (ТКРК) [4]. До складу ТКРК разом з α - і β -ланцюгами антигенрозпізнавального рецептора входить молекула CD3, що запускає процеси активації, а потім проліферації клітин [5]. У всіх обстежених хворих з В-ХЛЛ нижче норми кількість активованих Т-лімфоцитів з фенотиповими ознаками CD3⁺HLA-DR⁺. Експресія маркера HLA-DR на Т-клітинах є важливим показником, що характеризує їх здатність до активації – одного з ключових етапів формування повноцінної імунної відповіді [6, 7, 8, 9]. Це дає право стверджувати, що дисбаланс в Т-системі імунітету хворих на В-ХЛЛ, викликаний, з одного боку, недостатньою кількістю в ПК CD3⁺-лімфоцитів, а з іншого – зниженням рівня експресії ними активаційного антигену HLA-DR.

У результаті проведених досліджень встановлено, що більш виражені зрушення в Т-системі імунітету мали хворі на В-ХЛЛ з другої групи. У світлі сучасних уявлень про пухлинний процес очевидно, що малігнізовані клітини можуть активно впливати на розвиток імунологічних реакцій. Це здійснюється за рахунок експресії пухлинними клітинами численних антигенних структур,

які опосередковують їх вплив на інші клітини. Одним з маркерів на малігнізованих В-лімфоцитах, що часто виявляються, є Fas-ліганд (FasL), тоді як імунокомпетентні клітини цих же хворих експресують Fas-рецептор (FasR). У такій ситуації міжклітинні взаємовідносини пухлинних і імунокомпетентних лімфоцитів супроводжуються зменшенням клітин з маркерами CD3, CD4 і CD8 за рахунок реалізації в них апоптотичної програми, що опосередкована взаємодією FasR/FasL [10]. Отже, однією з можливих причин, що сприяють вираженому зниженню відсотка Т-лімфоцитів у хворих на В-ХЛЛ, може бути збільшення клону пухлинних клітин, що експресують FasL.

Ще одним значущим порушенням в імунній системі хворих на В-ХЛЛ є низький вміст в ПК числа ПКК і ТКК. Зменшення кількості цих клітин характеризує несприятливий стан неспецифічного протипухлинного захисту у цих хворих [11]. Відомо, що ефективність протипухлинного захисту організму залежить від багатьох факторів. Серед них велике значення має імуногенність пухлинних клітин, що важливо для індукції протипухлинного імунітету. Тут не менше значення відводиться CD4⁺- і CD8⁺-клітинам, які повинні бути функціонально активними і здатними розпізнавати пухлинні пептиди в комплексі з молекулами МНС класу 1 і 2. Однак презентація пухлинних пептидів антигенрозпізнавальними клітинами може бути повноцінною тільки в тому випадку, коли малігнізовані клітини експресують костимуляторні молекули (CD80, CD86), а імунокомпетентні клітини – їх ліганди (CD28, CD152 {CTLA-4}). Рівень експресії костимуляторних молекул на лейкоцих В-клітинах і їх лігандів на Т-лімфоцитах визначає ступінь ефективності імунної відповіді, що виражається або в її індукції, або в анергії. Незважаючи на те, що пухлинні клітини хворих на В-ХЛЛ експресують пухлино-асоційовані пептиди і молекули МНС класу 1, вони є не надто активними антигенпрезентуючими клітинами. Виходячи з цього, можна припустити, що у обстежених хворих на В-ХЛЛ є порушення механізмів, які контролюють експресію костимуляторних

молекул та їх лігандів. Підтвердженням цьому може бути пухлинна прогресія у даних хворих.

Висновки

Згідно з отриманими результатами, у хворих на В-ХЛЛ спостерігалися виражені імунологічні зрушення. Вони супроводжувалися Т-лімфопенією, дисбалансом субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з інверсією імунорегуляторного індексу, а також зниженням кількості ПКК і ТКК. Наявність в периферичній циркуляції хворих на В-ХЛЛ клону пухлинних клітин (більше 80%) корелює з низькими значеннями деяких показників клітинного імунітету.

Література

1. A systematic approach for peptide characterization of B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia cells / Díez P., Ibarrola N., Décano R. M. [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, no 26. – P. 42836-42846.
2. Finch S.C. Chronic leukemias. / S. C.Finch, M. S. Linet // *Baillere Hematol*. – 1992. – Vol. 5. – P. 27-56
3. Иммунологический мониторинг больных хроническим миелолейкозом в стадии клинико-гематологической компенсации на фоне иммуномодулирующей терапии. / Гордиенко Ал. И., Исакова Л. М., Третьяк Н. Н. [и др.] // *Імунологія та алергологія*. – 1998. – Т. 3. – С. 44-47.
4. Early T cell receptor signals globally modulate ligand:receptor affinities during antigen discrimination. / Pielak R. M., O'Donoghue G. P., Lin J. J. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2017. – Vol. 114, no 46. – P. 12190-12195.
5. Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens. / Hebeisen M., Allard M., Gannon P. O. [et al.] // *Front Immunol*. – 2015. – Vol. 6. – P. 3389-3399.
6. Гордиенко А. И. Экспрессия антигена HLA-DR на Т-лимфоцитах периферической крови больных острой миелоидной лейкемией в стадии

ремиссии. / Гордиенко А. И. // – Імунологія та алергологія. – 2002. – Т. 1. – С. 37-39.

7. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia / Giannopoulos K., Schmitt M., Kowal M. [et al.] // *Oncol Rep.* – 2008. – Vol. 20, no 3. – P. 677-682.

8. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease / D'Arena G., Laurenti L., Minervini M. M. [et al.] // *Leuk Res.* – 2011. – Vol. 35, no 3. – P. 363-368.

9. Increased frequency of CD8⁺ and CD4⁺ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression / Jadidi-Niaragh F., Yousefi M., Memarian A. [et al.] // *Cancer Invest.* – 2013. – Vol. 31, no 2. – P. 121-131.

10. Synergistic induction of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells after treatment with all-trans retinoic acid in combination with interleukin-21 and rituximab / Abbaszadeh-Goudarzi K., Shokri F., Hosseini M. [et al.] // *J Cancer Res Ther.* – 2016. – Vol. 1, no 4. – P. 1278-1283.

11. NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma / Parry H. M., Stevens T., Oldreive C. [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, no 42. – P. 68513-68526.

Надійшла 10.11.2017 року

УДК 616.155.392.8-08

**СУЧАСНІ НАПРЯМИ ОПТИМІЗАЦІЇ ЛІКУВАННЯ ДОРΟΣЛИХ
ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ**

Н. В. Горяїнова

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. Стаття є оглядовою і висвітлює шлях гематології до персоналізованого лікування гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ). Показано, що виявлення нових предикторів перебігу захворювання та механізмів впливу на системи, що відповідають чутливості лейкемічних клітин до цитостатичної дії, все ближче підводить нас до персоналізованої терапії та подолання медикаментозної резистентності. Охарактеризовано розвиток таргетної терапії, яка дозволяє проводити корекцію наявних порушень на генетичному, імунному та біохімічному рівнях, та основні напрями оптимізації лікування ГМЛ на сучасному етапі.

Ключові слова: гостра мієлоїдна лейкемія, персоналізоване лікування, таргетна терапія.

MODERN DIRECTIONS OF TREATMENT OPTIMIZATION OF ADULT PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

N. V. Goryainova

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Resume. The article is an overview and highlights the path of hematology to personalized treatment for acute myeloid leukemia. It has been shown that the detection of new predictors of the course of the disease and the mechanisms of influence on systems that correspond to the sensitivity of leukemic cells to cytostatic action are bringing us closer to personalized therapy and to overcome drug resistance. The development of targeted therapy, which allows correction of existing disorders on the genetic, immune and biochemical levels, and the main directions of optimization of AML treatment at the present stage is characterized.

Key words: acute myeloid leukemia, personalized treatment, targeted therapy.

Концепція диференціації терапії ще з 1970 року розглядалась як перспективний і революційний підхід до лікування гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ). Проте її клінічне застосування було успішно реалізовано тільки з кінця 1980-х рр. і лише при одному ФАБ-варіанті ГМЛ – гострій промієлоцитарній лейкемії (ГПЛ, М3). Тоді почала ефективно використовуватись повністю-трансретиноева кислота (АТРА), застосування якої в поєднанні з хіміотерапією (ХТ) зробило раніше невиліковну й тяжку хворобу майже у 90% виліковною. Пізніше такий варіант лейкемії почали лікувати триоксидом миш'яку, який, як і АТРА, виявив спроможність викликати диференціювання лейкоциічних клітин у зрілі та індукувати деградацію лейкоциічного ураження, представляючи загальну потенційну парадигму диференціації терапії в клінічній онкогематології.

Задум диференціації терапії отримав подальший розвиток у вигляді персоналізованого лікування. Європейською асоціацією гематологів із 2012 року запроваджено на щорічному конгресі асоціації визначати найактуальніші напрями досліджень сучасної гематології та обирати тему року (<http://www.ehaweb.org/news/eha-news/>). Так, рік 2012-2013 було оголошено роком якості життя при гематологічних захворюваннях, рік 2013-2014 присвячено проблемам віку та старіння при розладах у системі крові, рік 2014-2015 названо роком персоналізованої медицини в гематології, у 2015-2016 році темою року стали інновації у гематології, у 2016-2017 році в центрі уваги – сучасні гематологічні дослідження, а 2017-2018 рік оголошено роком імунотерапії при гематологічних захворюваннях. Є очевидним, що всі перераховані тематичні напрями сучасної гематології підводять нас саме до персоналізованого лікування.

Досягнуті успіхи терапії лейкемії пов'язані, передусім, із розробкою методів знищення пухлинних клітин в організмі хворої людини. Повнота звільнення організму від злоякісних клітин визначає вірогідність виліковування, яке може бути повним за умови пригнічення виживаності залишкової (мінімальної) кількості цих клітин із відновленням нормальних тканин і механізмів природного захисту організму від пухлинного росту. Виявлення нових предикторів перебігу захворювання та механізмів впливу на системи, що відповідають чутливості лейкемічних клітин до цитостатичного впливу, все ближче підводить нас до персоналізованої терапії та подолання медикаментозної резистентності [13].

Персоналізована медицина – це модель організації медичної допомоги пацієнтам, що будується на виборі діагностичних, профілактичних і лікувальних засобів, котрі є оптимальними для певної особи при врахуванні її генетичних, фізіологічних, біохімічних та інших особливостей. Сучасний рівень організації медичної допомоги неможливий без медико-генетичного забезпечення і застосування технологій молекулярної генетики.

Молекулярно-генетичні маркери можуть використовуватись для ризик-адаптованого та персоналізованого лікування [21], що значно знизить імовірність розвитку рецидиву ГМЛ і зменшить кількість небажаних побічних ефектів. Взавши до уваги гетерогенність ГМЛ, особливо у проміжній цитогенетичній групі ризику, на фоні поглиблення розуміння молекулярно-генетичних чинників у виникненні та розвитку лейкемії, сьогодні проводиться переоцінка значущості ТГСК у різних прогностичних групах [13]. Так, уже доведено, що ТГСК є найоптимальнішим методом лікування при виявленні мутацій FLT3, С-KIT, RUNX1 [3]. Водночас за наявності у хворих на ГМЛ мутації NPM1 без FLT3/ITD або С/EBPa ТГСК є недоцільною, тому що такі пацієнти дуже добре відповідають на ХТ [10, 11].

На теперішній час особливого значення набув розвиток таргетної терапії, яка дозволяє проводити корекцію наявних порушень на генетичному та біохімічному рівнях. Найбільш яскравим та відомим прикладом лікарського засобу, який вже багато років використовується в гематологічній практиці в якості таргетної терапії, окрім АТРА, є іматинібу мезилат (Imatinib mesylate). Поява цього препарату призвела до революційних змін у лікуванні хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). Тому стає зрозумілим, що знання про наявність молекулярно-біологічних аномалій необхідне не тільки для прогнозування перебігу ГМЛ, а й для розробки нових лікарських засобів, діючих на конкретні мутаційні мішені, що, як очікується, значно змінить клінічний перебіг та результативність лікування ГМЛ.

Велика увага зараз приділяється дослідженням білка с-KIT (CD117), який є рецепторною тирозинкіназою і бере участь у таких важливих для пухлинної прогресії процесах як стимуляція проліферації клітин, зниження чутливості до апоптотичних сигналів, міграції та адгезії [26]. Висока експресія с-KIT є дійсно частою знахідкою при ГМЛ, доведеною нашими дослідженнями (у 83% випадків), що навіть дещо більше аналогічних даних, отриманих іншими дослідниками [1, 23, 32]. Враховуючи, що гіперекспресія чи мутації с-KIT

стабільно спостерігаються в більшості хворих на ГМЛ, це стало поштовхом для розробки різноманітних хіміотерапевтичних препаратів, які б інгібували активність тирозинкінази c-KIT [33].

Ефективність елімінації c-KIT-позитивних клітин інгібіторами тирозинкіназ була неодноразово доведена як *in vitro*, так і *in vivo* [1, 14, 23]. Найвідомішим із них, як вже зазначалось, є глівек (Gleevec, STI571) – інгібітор тирозинкіназ, специфічний у відношенні BCR-ABL, PDGFR і c-KIT [6]. Дослідження, проведені на модельних лініях лейкемічних клітин, свідчать про значне зниження проліферації та пригнічення антиапоптотичного ефекту, викликаного активацією c-KIT. У свіжих зразках клітин крові, отриманих від хворих, ці ефекти були виражені значно слабше [17, 35]. Проведені клінічні випробування не виявили значного терапевтичного ефекту STI571 у відношенні c-KIT-позитивних хворих на ГМЛ [22]. Дослідження кристалічної структури рецептора та інгібітора показало, що STI571 не може бути ідеальним пригнічувачем c-KIT. Він діє як конкурентний інгібітор – з'єднується з АТФ-зв'язуючим сайтом і не дає рецептору активуватися. Однак молекула STI571 занадто велика і руйнує в рецепторі зв'язки, що забезпечують інактивовану конформацію [30].

SU6668 і SU5416 – це низькомолекулярні інгібітори тирозинкіназ VEGFR-1, VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3, c-KIT, FLT3. Дослідження, проведені на модельній лінії і на бластних клітинах крові хворих на ГМЛ, продемонструвало ефективність цих інгібіторів – знижувалась проліферація, підвищувалась чутливість до апоптозу. У дослідах на мишах показано, що SU6668 і SU5416 інгібують метастазування, формування мікросудин і проліферацію клітин. Клінічні дослідження також були успішними, однак питання про те, чи є ці позитивні результати наслідком пригнічення саме c-KIT, чи вся справа в інгібуванні рецептора фактора росту ендотелію (VEGFR), поки залишається відкритим [6].

Дазатиніб (Dasatinib, BMS-354825) – специфічний інгібітор кіназ Src і BCR/ABL, який показав позитивні результати в клінічних випробуваннях із хворими на ХМЛ. На прикладі клітинних ліній встановлено, що дазатиніб інгібує ліганд-залежне фосфорилування c-KIT і проліферацію бластних клітин. У проведених клінічних дослідженнях препарату у резистентних CD117-позитивних пацієнтів із ГМЛ дазатиніб продемонстрував дуже непогані результати – у всіх пацієнтів спостерігалось значне покращення картини крові; за допомогою додаткових препаратів у деяких вдалося досягти повної ремісії [29].

Сорафеніб (Sorafenib) – спочатку розроблявся як інгібітор тирозинкіназ C-RAF і B-RAF, проте пізніше виявилось, що він інгібує і інші тирозинкінази, зокрема c-KIT. На прикладі клітинних ліній доведено, що Сорафеніб інгібує ліганд-залежне фосфорилування c-KIT і проліферацію клітин. На теперішній час цей препарат використовується для лікування раку нирок і печінки, планується застосовувати при терапії раку щитовидної залози [14], але на нього покладаються й великі сподівання щодо ГМЛ.

Сунітиніб (Sunitinib, SU11248) – низькомолекулярний інгібітор тирозинкіназ, зокрема c-KIT, PDGFR, VEGFR, FLT3. На прикладі клітинних ліній було показано, що SU11248 інгібує ліганд-залежне фосфорилування c-KIT і проліферацію клітин; застосування сунітинібу у хворих на ГМЛ викликає ремісію [26].

На даний час ведуться передклінічні та клінічні дослідження й інших інгібіторів тирозинкіназ, що впливають на c-KIT, таких як Kill502, PD180970 і MLN518, РКС412, АВТ-869 [1], вивчаються нові комбінації лікарських засобів [4]. Очікується, що після проходження всіх фаз клінічних випробувань використання відповідних інгібіторів тирозинкіназ стане звичайною практикою, а реакція на терапію у хворих із більш високою експресією CD117 буде більш значною. У зв'язку з цим, рутинне визначення експресії CD117 вже зараз уявляється доцільним. Крім того, для стратифікації лікування й прийняття

рішення відносно цільової терапії з анти-с-KIT у пацієнтів із високою експресією CD117 може бути необхідним визначення виду мутації всередині гена, що забезпечить більш точний вибір інгібітора.

Дві з найпоширеніших генетичних мутацій у пацієнтів з ГМЛ – це мутації FLT3 та IDH1/2, що виникають приблизно у 30% та 20% хворих на ГМЛ відповідно. Мідостаурін (Midostaurin, колишній PKC412) був схвалений для клінічного використання у США в квітні 2017 р. для лікування хворих на ГМЛ з мутацією FLT3 у поєднанні з інтенсивною ХТ. Мідостаурін є інгібітором FLT3, С-KIT, PDGFRB, VEGFR-2 і протеїнкінази С (PKC). У результаті проведеного міжнародного рандомізованого плацебо-контрольованого дослідження (RATIFY) було доведено, що мідостаурін у поєднанні з ХТ «7+3» в якості індукційного і консолідуючого лікування та подальшої підтримуючої монотерапії протягом 12 місяців значно покращує виживаність (8 місяців проти 3,6) і зменшує ризик смертності на 23 % у порівнянні з плацебо та стандартною ХТ [37].

Гілтеритиніб (Gilteritinib, ASP2215) – новий пероральний інгібітор FLT3 та AXL, який поширюється як на мутації FLT3/ITD, так і на TKD. Клінічні випробування фази 1/2 (CHRYSALIS) при рецидивних/резистентних ГМЛ показали добру переносимість у широкому діапазоні доз, послідовну й потужну інгібіцію FLT3 у корелятивних дослідженнях із загальною відповіддю на лікування 55% та збільшенням виживаності порівняно з ХТ й додаванням інших інгібіторів FLT3 [34].

Квізартиніб (Quizartinib, AC220) – це інгібітор тирозинкінази з невеликими молекулярними рецепторами, який в даний час знаходиться у фазі 3 клінічних випробувань (QuANTUM-First і QuANTUM-R) для лікування ГМЛ в першій лінії в поєднанні з індукційною та консолідаційною ХТ та в якості підтримуючої монотерапії у хворих з FLT3/ITD-мутаціями. Quizartinib не інгібує FLT3/TKD [27].

Креноланіб (Crenolanib) є перорально біодоступним, селективним інгібітором малих молекул тирозинкіназ типу III з наномолярними потенціями проти рецепторів фактору росту тромбоцитів (PDGFR) (ізоформи PDGFR α і PDGFR β) і FLT3. Креноланіб, як панселективний інгібітор FLT3, може подолати резистентність до квізартиніба. У хворих на ГМЛ з мутацією FLT3 застосування креноланібу в якості монотерапії дозволило отримати загальну частоту відповіді 30%, незважаючи на те, що 65% пацієнтів раніше отримували інші інгібітори FLT3 [31].

На даний час розробляються інгібітори ізоцитратдегідрогеназ 1 і 2 (IDH1 та IDH2), онкогенним метаболітом яких є 2-гідроксіглутурат (що призводить до лейкемічної трансформації). Два таргетні IDH-інгібітора, еназіденіб (Enasidenib, AG221) і івозіденіб (Ivosidenib, AG120), зараз проходять клінічні випробування [9].

Венетоклакс (Venetoclax) є селективним інгібітором BCL-2, який у комбінації з гіпометилюючими агентами децитабін або азацитидін у 22 пацієнтів, яким протипоказана стандартна індукційна ХТ, продемонстрував 75% і 70% загальної відповіді на терапію відповідно [42]. В даний час Венетоклакс схвалений для хронічної лімфоцитарної лейкемії.

Возароксін (Vosaroxin), що є похідною хінолону, показав клінічно значущі переваги в лікуванні хворих на ГМЛ, резистентних до стандартної ХТ [36].

Найближчим часом планується втілити в клінічну гематологічну практику для терапії ГМЛ моноклональні і кон'юговані антитіла. У першу чергу, мова йде про анти-CD33 антитіла, зокрема гемтузумаб озогаміцін (Gemtuzumab ozogamicin), який після внутрішньоклітинного гідролізу індукує розриви ланцюга ДНК, апоптоз і загибель лейкемічних клітин. Щоб підвищити селективність дії цитотоксичних агентів, на основі моноклональних антитіл (МКА) були розроблені антитіла, де МКА об'єднані з хіміотерапевтичним засобом. Гемтузумаб озогаміцін (ГО) – це кон'югат цитотоксичного агента

каліхеаміцину з рекомбінантними гуманізованими МКА, спрямованими проти антигена CD33, який експресується на бластних клітинах у більш ніж 90% хворих на ГМЛ [38]. ГО показав найкращі результати у пацієнтів із ГМЛ сприятливої і проміжної груп цитогенетичного ризику, але виявився майже неефективним за наявності експресії бластними клітинами Pgp-170, тому була здійснена спроба поєднати його з циклоспорином А. ГО став першим офіційно схваленим протираковим імунокон'югатом у США [38], незважаючи на те, що в минулому десятиріччі використання цього препарату було зупинено і заборонено в Європі внаслідок його нібито надтоксичності. Однак в останні роки випробування ГО знову поновились і дані багатьох добре контрольованих досліджень показують [5, 8, 15, 38, 41], що він покращує виживаність у значної кількості пацієнтів із ГМЛ, а CD33 все ж таки є клінічно значущою мішенню при ГМЛ [2].

Нині проводяться клінічні випробування й інших анти-CD33 кон'югованих антитіл, наприклад, AVE9633 й Вадастуксімаб талірін (Vadastuximab talirin) [12, 39]. AVE9633 є новим імунокон'югатом, що містить гуманізовані моноклональні антитіла до CD33-антигенів, пов'язаний через дисульфідний зв'язок із цитотоксичним агентом і сильним інгібітором тубуліну [38]. Вадастуксімаб талірін є кон'югатом токсину антитіл, який зв'язується з CD33, вивільняє димор пірролобензодіазепіну (PBD), який перетинає ДНК, що веде до загибелі клітин [12].

Медикаментозна резистентність, яка є наслідком порушення процесів апоптозу [16, 18], може бути віднесена до найбільш несприятливого прогностичного фактора перебігу ГМЛ, тому що в цьому випадку клітини є перехресно і універсально резистентними до дії цитостатичних препаратів. Основною перешкодою до реалізації протипухлинного ефекту хіміотерапевтичного засобу є порушення здатності клітини до його накопичення в достатній концентрації, унеможливлення досягнення препаратом внутрішньоклітинних мішеней [20]. Результати досліджень

останніх років дозволили довести залежність результатів лікування ГМЛ від експресії лейкемічними клітинами транспортного протеїну Pgp-170.

Оскільки Pgp-170 є суттєвою причиною медикаментозної резистентності при ГМЛ, особливо у літніх пацієнтів, велика увага зараз приділяється розробці Pgp-модуляторів, які блокують Pgp-опосередкований відтік ліків із лейкемічних клітин і використовуються в поєднанні зі стандартною ХТ. Таким Pgp-модулятором, що переживає нині клінічні випробування, є зосуквідар (Zosuquidar), який, вважається, повинен повернути хімічну стійкість цитостатикам [40].

Зосуквідар повністю або частково відновлює медикаментозну чутливість у всіх Pgp-позитивних лейкемічних клітинних лініях і посилює цитотоксичність ГО і антрациклінів (даунорубіцину, ідарубіцину, мітоксантрону та ін.) у гострому періоді ГМЛ. Крім того, доведено, що зосуквідар є значно потужнішим, ніж циклоспорин А в клітинах із високою активністю Pgp-170. Вже завершені етапи досліджень довели, що зосуквідар може бути ефективним доповненням до ХТ для хворих на ГМЛ з експресією бластними клітинами Pgp-170, особливо в літніх пацієнтів [40].

На сьогоднішній день проходять клінічні випробування терапевтичні агенти, дія яких спрямована на інші шляхи, що відіграють ключову роль у виникненні лейкемій.

СРХ-351 являє собою ліпосомальну композицію, що містить фіксовану комбінацію цитарабіну та даунорубіцину з ліпосомальною часткою в молярному співвідношенні 5:1. СРХ-351 є єдиним агентом, який завершив дослідження фази 3 для ГМЛ, в якому його порівнювали зі стандартною індукційною ХТ “7+3” у пацієнтів віком від 60 до 75 років із ГМЛ високого ризику. Хворі, які були рандомізовані до СРХ-351, продемонстрували більш високий рівень відповіді та довшу загальну виживаність (9,6 місяця з СРХ-351 проти 6 місяців для стандартної індукційної терапії) [24, 25].

Гуадецитабін (Guadecitabine, SGI110) - це динуклеотид децитабіну і деоксігуанозину, який збільшує екскрецію децитабіну *in vivo*, захищаючи його від дезамінування. Попередні результати дослідження фази 1 показали, що гуадецитабін підшкірно в дозі 60 мг/м² щоденно протягом 5 днів добре переноситься й є клінічно та біологічно активним у пацієнтів з ГМЛ [19].

Нові цитостатичні агенти таргетної дії та нові терапевтичні стратегії повинні покращити результативність лікування ГМЛ. Це стає можливим завдяки більш глибокому розумінню молекулярних механізмів різноманітності захворювання. Дослідження майбутнього зосередяться, найвірогідніше, на індивідуальних лікувальних стратегіях для пацієнтів, заснованих на певній біології ГМЛ, із певними ризик-факторами, тому що традиційні цитостатичні режими на теперішній час досягли межі свого потенціалу [7, 43, 44].

Терапевтичний арсенал практичного гематолога в найближчому майбутньому поповнять препарати прицільної дії. Це дасть змогу нарешті відійти від схеми "7+3", яка вже близько 50 років є основною в лікуванні ГМЛ. Майбутні терапії ГМЛ є надзвичайно обнадійливим у плані очікування значного покращення і методів, і результатів лікування ГМЛ. Тому перспективи терапії ГМЛ, зокрема й резистентних форм, із кожним днем виглядають дедалі оптимістичнішими.

Література

1. Advani A. S. C-KIT as a target in the treatment of acute myelogenous leukemia / A. S. Advani // *Curr. Hematol. Rep.* – 2005. – Vol. 4, № 1. – P. 51–58.
2. Gemtuzumab Ozogamicin Versus Best Supportive Care in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Unsuitable for Intensive Chemotherapy: Results of the Randomized Phase III EORTC-GIMEMA AML-19 Trial / Amadori S., Suci S., Selleslag D. [et al.] // *Journal of Clinical Oncology.* – 2016. – Vol. 34(9).- P. 972-979.
3. Basara N. Early related or unrelated haematopoietic cell transplantation results in higher overall survival and leukaemia-free survival compared with conventional

chemotherapy in high-risk acute myeloid leukaemia patients in first complete remission / N. Basara // *Leukemia*. – 2009. – Vol. 23. – P. 635–640.

4. Replacing Gemtuzumab Ozogamicin With Idarubicin In Frontline Fludarabine, Cytarabine and G-CSF Based Regimen Does Not Compromise Outcome In Core Binding Factor Acute Myelogenous Leukemia / Borthakur G., Cortes J. E., Ravandi F. [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – P. 3971.

5. Gemtuzumab ozogamicin for treatment of acute myeloid leukemia / Brotelle T., Lemal R., Moluçon-Chabrot C. [et al.] // *Bull. Cancer*. – 2014. – Vol. 101 (2). – P. 211–218.

6. Incidence and prognosis of C-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias / Care R. S., Valk P. J. M., Goodeve A. C. [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2003. – Vol. 121. – P. 775–777.

7. Molecular therapy for acute myeloid leukemia / [Coombs C.C., Tallman M.S., Levine RL.] // *Nature Reviews*. – 2016. – Vol. 13. – P. 305-318.

8. Antibody-based therapy of acute myeloid leukemia with gemtuzumab ozogamicin / [Cowan A. J., Laszlo G. S., Estey E. H., Walter R. B.] // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2013. – Vol. 18. – P. 1311–1334.

9. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML / DiNardo C.D., Ravandi F., Agresta S. [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2015a. – Vol. 90 (8). – P. 732-736.

10. Dohner H. Acute Myeloid Leukemia / Dohner H., Weisdorf D.J., Bloomfield C.D. // *NEJM*. – 2015. – Vol. 373. – P. 1136-1152.

11. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel / Dohner H., Estey E., Grimwade D. [et al.] // *Blood*. – 2017. – Vol. 129(4). – P.424-447.

12. A phase 1b study of vadastuximab talirine in combination with 7+3 induction therapy for patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML). / Erba H.P., Levy M.Y., Vasu S. [et al.] // Presented at: 58th American Society of Hematology Annual Meeting; San Diego, CA; December 3-6. 2016. - Abstract 906.

13. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach / Gerstung M., Papaemmanuil E., Martincorena I. [et al.] // *Nature Genetics*. – 2017. – Vol. 49. – P. 332-340.

14. Results of a multicenter phase II trial for older patients with C-KIT-positive acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (HR-MDS) using low-dose ara-C and imatinib / Heidel F., Cortes J., Rucker F. G. [et al.] // *Cancer*. – 2007. – Vol. 109. – P. 907–914.

15. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials / Hills R. K., Castaigne S., Appelbaum F. R. [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol. 15 (9). – P. 986–996.

16. Hirose M. Biology and modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies / M. Hirose // *Int. J. Hematol.* – 2002. – Vol. 76, № 2. – P. 206–211.

17. Expression and functional role of the proto-oncogene C-KIT in acute myeloblastic leukemia cells / Ikeda H., Kanakura Y., Tamaki T. [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 11. – P. 2962–2968.

18. Inoue S. Apoptosis and anticancer drug resistance / S. Inoue, A. E. Salah-Eldin, K. Omoteyama // *Hum. cell.* – 2001. – Vol. 1, № 3. – P. 211–221.

19. Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. / Issa J.P., Roboz G., Rizzieri D. [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2015. – Vol. 16(9). – P. 1099-1110.

20. Katayama K. FBXO15 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin-proteasome pathway in cancer cells / K. Katayama, K. Noguchi, Y. Sugimoto // *Cancer Science*. – 2013. – Vol. 104, № 6. – P. 694–702.

21. Gemtuzumab ozogamicin for treatment of newly diagnosed acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis / Kharfan-Dabaja M. A., Hamadani M., Reljic T. [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 163 (3). – P. 315–325.

22. KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)- acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor / Kohl T. M., Schnittger S., Ellwart J. W. [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – P. 3319–3321.

23. Initial testing of dasatinib by the Pediatric Preclinical Testing Program / Kolb E. A., Gorlick R., Houghton P. J. [et al.] // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2008. – Vol. 50. – P. 1198–1206.

24. Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML / Lancet J.E., Cortes J.E., Hogge D.E. [et al.] // *Blood*. – 2014. – Vol. 123(21). – P. 3239-3246.

25. Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7+3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML [abstract] / Lancet J.E., Uy G.L., Cortes J.E. [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34(suppl). Abstract 7000.

26. C-KIT signal transduction and involvement in cancer / Lennartsson J., Voytyuk O., Heiss E. [et al.] // *Cancer Ther.* – 2005. – Vol. 3. – P. 5–28.

27. The benefit of treatment with quizartinib and subsequent bridging to HSCT for FLT3-ITD(+) patients with AML / Levis M.J., Martinelli G., Perl A.E. [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 32:5s (suppl; abstr 7093).

28. Löwenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia / B. Löwenberg // *Blood*. – 2013. – Vol. 121. – P. 26–28.

29. Adding The KIT Inhibitor Dasatinib (DAS) To Standard Induction and Consolidation Therapy For Newly Diagnosed Patients (pts) With Core Binding Factor (CBF) Acute Myeloid Leukemia (AML): Initial Results Of The CALGB 10801 (Alliance) Study / Marcucci G., Geyer S., Zhao J. [et al.] // *Blood*. – 2013. – P. 357.

30. Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia / O'Farrell A. M., Yuen H. A., Smolich B. [et al.] // *Leuk. Res.* – 2014. – Vol. 28. – P. 679–689.

31. Efficacy of a Type I FLT3 Inhibitor, Crenolanib, with Idarubicin and High-Dose Ara-C in Multiply Relapsed/Refractory FLT3+ AML / Ohanian M., Kantarjian H.M., Borthakur G. [et al.] // Presented at the 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Diego, CA; December 3-6, 2016. Abstract 2744.

32. Prognostic impact of C-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia / Park S. H., Chi H. S., Min S. K. [et al.] // *Leuk Res.* – 2011. – Vol. 35. – P. 1376–1383.

33. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia // Patel J. P., Gönen M., Figueroa M. E. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, № 12. – P. 1079–1089.

34. Final Results of the Chrysalis Trial: A First-in-Human Phase 1/2 Dose-Escalation, Dose-Expansion Study of Gilteritinib (ASP2215) in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (R/R AML) / Perl A.E., Altman J.K., Cortes J.E. [et al.] // Presented at the 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Diego, CA; December 3-6, 2016. Abstract 1069.

35. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies / Schittenhelm M. M., Shiraga S., Schroeder A. [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 66. – P. 473–481.

36. Improved survival in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) treated with vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine: results of a phase 3 double-blind randomized controlled multinational study (VALOR) / Ravandi F., Ritchie E., Sayar H. [et al.] // American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting. December 6-9, 2014; San Francisco, CA. Abstract LBA-6.

37. Stone R.M. The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin Prolongs Survival Compared with Placebo in Combination with Daunorubicin/Cytarabine Induction, High-Dose C Consolidation, and As Maintenance Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Patients Age 18-60 with FLT3 Mutations: An International

Prospective Randomized P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]) / Stone R.M. // Presented at the 57th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting; Orlando, FL; December 5-8, 2015. Abstract 6.

38. Takeshita A. Efficacy and resistance of gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia / A. Takeshita // Int. J. Hematol. – 2013. – Vol. 97 (6). – P. 703-716.

39. P-gp activity is a critical resistance factor against AVE9633 and DM4 cytotoxicity in leukaemia cell lines, but not a major mechanism of chemoresistance in cells from acute myeloid leukaemia patients / Tang R., Cohen S., Perrot J-Y. [et al.] // BMC Cancer. – 2009. – Vol. 9. – P. 199.

40. Zosuquidar restores drug sensitivity in P-glycoprotein expressing acute myeloid leukemia (AML) / Tang R., Faussat A-M., Perrot J-Y. [et al.] // BMC Cancer. – 2008. – Vol. 8. – P. 51.

41. Thol F. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia revisited / F. Thol, R. F. Schlenk // Expert Opin Biol Ther. – 2014. – Vol. 14 (8). – P. 1185–1895.

42. Safety and Efficacy of Venetoclax Plus Low-Dose Cytarabine in Treatment-Naive Patients Aged ≥ 65 Years with Acute Myeloid Leukemia / Wei A., Strickland S.A., Roboz G.J. [et al.] // Presented at the 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Diego, CA; December 3-6, 2016. Abstract 102.

43. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes / Welch J.S., Petti A.A., Miller C.A. [et al.] // N Engl. J. Med. – 2016. – Vol. 375(21). – P. 2023-2036.

44. Xavier T. Acute Myeloid Leukemia in the Elderly Patient: New Strategies / T. Xavier // Rare Cancers Ther. – 2015. – Vol. 3. – P. 1–11.

Надійшла 30.10.2017 р.

УДК 616-006.441:616.411-089.87

**СПЛЕНЕКТОМІЯ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНИХ
ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНИХ НЕОПЛАЗІЙ, УСКЛАДНЕНИХ
АВТОІМУННОЮ ГЕМОЛІТИЧНОЮ АНЕМІЄЮ**

**Ю. Л. Євстахевич, І. Й. Євстахевич, М. М. Семерак, О. Я. Виговська, В. Є.
Логінський**

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Резюме. Метою роботи було проведення ретроспективного аналізу безпосередніх та віддалених результатів спленектомії у хворих на хронічні лімфопрولیферативні неоплазії, ускладнені автоімунною гемолітичною анемією, на основі тридцятирічного досвіду виконання таких операцій у клініці.

Матеріали і методи. 14 хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ) і 10 хворих на негоджкінські лімфоми (НГЛ), ускладнені автоімунною гемолітичною анемією (АІГА), яким було виконано спленектомію.

Результати. Спленектомія була ефективною у 100% хворих на НГЛ і 85,7% пацієнтів на ХЛЛ: припинився гемоліз, видалено велику масу пухлини, ліквідовано гіперспленізм, знизилась або зникла потреба у проведенні хіміотерапії. Віддалені результати операційного лікування при ХЛЛ є гіршими: медіана безподійного виживання EFS дорівнювала 12,0 міс., а медіана загального виживання OS була 25,5 міс.. При НГЛ EFS становила 29,0 міс, а OS – 31,0 міс.. У пацієнтів на ХЛЛ із III ст. за Rai середній час виживання після спленектомії складав 77,6 міс., а із IV ст. за Rai – 54,5 міс..

Висновок. Спленектомія надалі відіграє провідну роль у лікуванні хронічних лімфопрولیферативних неоплазій, ускладнених автоімунною гемолітичною анемією.

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, негоджкінська лімфома, автоімунна гемолітична анемія, спленектомія.

**SPLENECTOMY IN THE MANAGEMENT OF CHRONIC
LYMPHOPROLIFERATIVE NEOPLASIAS COMPLICATED WITH
AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA**

**Y. L. Yevstakhevych, I. Y. Yevstakhevych, M. M. Semerak, O. Y.
Vyhovska, V. E. Loginsky**

SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine", Lviv

Abstract. Aim of study: We performed a retrospective analysis of short-term and long-term outcomes of splenectomy in patients with chronic lymphoproliferative neoplasias, complicated with autoimmune hemolytic anemia.

Materials and Methods: 14 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and 10 patients with non-Hodgkin lymphomas (NHL), complicated with autoimmune hemolytic anemia (AIHA) having undergone splenectomy.

Outcomes. Splenectomy proved effective in 100 % patients with NHL and in 85,7 % patients with CLL: reversal of hemolysis, resection of a big tumor mass, alleviation of hypersplenism, decreased or no need in chemotherapy. Long-term outcomes of surgical treatment in CLL proved

less promising: median event-free survival (EFS) was 12.0 months, and median overall survival (OS) was 25.5 months. EFS and OS in patients with NHL reached 29.0 months and 31.0 months, resp. Mean post-splenectomy survival in patients with Rai III stage of CLL and Rai IV stage of CLL reached 6 months and 54.5 months, resp.

Conclusion. *Splenectomy remains to be a leading treatment of choice in the management of chronic lymphoproliferative neoplasias, complicated with autoimmune hemolytic anemia.*

Key words: *chronic lymphocytic leukemia, non-Hodgkin lymphoma, autoimmune hemolytic anemia, splenectomy.*

Вступ. Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) та негоджкінські лімфоми (НГЛ) належать до лімфопрولیферативних неоплазій, які інколи ускладнюються автоімунною гемолітичною анемією (АГА). Зокрема, при НГЛ, АГА трапляється у 2,0-3,0%, а при ХЛЛ у 5,0-10,0% випадків [5]. На сучасному етапі найбільш ефективним лікуванням цих захворювань є хіміотерапія із кортикостероїдами. Проте, наявність АГА, в комбінації з масивною спленомегалією може суттєво знижувати ефективність цитостатиків [10]. Великі розміри селезінки спричинюють абдомінальний дискомфорт, регіональну портальну гіпертензію (РПГ) та гіперспленізм. В таких випадках виникає питання про доцільність проведення спленектомії.

Метою роботи було проведення ретроспективного аналізу безпосередніх та віддалених результатів спленектомії у хворих на хронічні лімфопрولیферативні неоплазії, ускладнені автоімунною гемолітичною анемією, на основі тридцятирічного досвіду виконання таких операцій у клініці.

Матеріали і методи Протягом 1986 – 2016 рр. у відділенні загальної та гематологічної хірургії ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» та на базі хірургічного відділення 5-ої МККЛ м. Львова серед 41 спленектомій у хворих на ХЛЛ виконано 14 операцій при ХЛЛ, ускладненій АГА (І група) та серед 111 спленектомій у хворих на НГЛ проведено 10 операцій у пацієнтів із супутньою АГА (ІІ група). Діагностика ХЛЛ здійснювалась на основі клініко-лабораторних даних за критеріями Національного ракового інституту (NCI): збільшення лімфатичних вузлів, симптомів інтоксикації, гепато- і спленомегалії, лімфоцитозу в периферичній крові (абсолютний лімфоцитоз більше 5 Г/л), кількості лімфоцитів в кістковому

мозку >30 % при підрахунку мієлограми, характерних імунофенотипових особливостей (CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD23⁺, CD5⁺/CD19⁺).

Діагностику НГЛ і її варіанту проводили на основі результатів клініко-інструментального обстеження, цитологічного дослідження периферичної крові, кісткового мозку, пунктатів і відбитків уражених органів, гістологічного дослідження біопсій видалених лімфовузлів і/або селезінки, імунофенотипової характеристики злоякісних клітин досліджуваних тканин відповідно до актуальних класифікацій (WF, REAL з наступним уточненням за класифікацією ВООЗ). Поширення (стадію) хвороби оцінювали на основі клінічного, рентгенологічного, ультрасонографічного обстежень та при комп'ютерній томографії за системою стадіювання Ann-Arbor. Спленектомію виконували під інтубаційним наркозом або під перидуральною анестезією з верхньо-серединної лапаротомії. У хворих з масивною спленомегалією (вага селезінки >3 кг), вираженим периспленітом та наявністю міжорганних судинних анастомозів внаслідок РПГ лапаротомний розріз продовжували до лонного з'єднання. З 2002 р. для запобігання постспленектомічної інфекції всіх хворих перед видаленням селезінки імунізували вакцинами проти капсульних бактерій.

Результати спленектомії оцінювали безпосередньо після видалення селезінки (на 14-16 день) і у віддаленому часі (2-246 міс).

Результати та їх обговорення. Спленектомію проведено у 14 хворих на ХЛЛ, ускладнену АІГА (I група). Серед пацієнтів переважали особи чоловічої статі віком 40-75 років (10 осіб), та жінки 35-59 років (4 особи), медіана віку становила 48 років. За класифікацією Rai 8 пацієнтів мали III стадію і 6 - IV стадію захворювання. При поступленні в хірургічне відділення хворі скаржилися на загальну слабкість, періодичні болі в лівому підребер'ї, задишку, втомлюваність, у окремих пацієнтів була підвищена температура тіла (1-2 ступінь за шкалою ECOG). Тривалість хвороби до спленектомії становила 14-94 міс. При проведенні фізикальних обстежень у 2 пацієнтів пальпувались збільшені периферичні лімфовузли, а у 10 хворих була виявлена гепатомегалія.

Спленомегалію констатували у всіх випадках: селезінка займала всю ліву половину живота, а в одного пацієнта її нижній полюс опускався в малий таз. У всіх хворих відзначалась іктеричність шкірних покривів і склер, зниження вмісту гемоглобіну 44-94 г/л ($n=10$), кількість ретикулоцитів становила 22-140% і на цьому фоні зростав рівень білірубіну за рахунок непрямой фракції; у більшості хворих позитивним був прямий тест Кумбса. Гемоліз у всіх пацієнтів приєднувався через 1-4 роки після початку хвороби, а у 2 випадках ХЛЛ перебігав з гемолітичними кризами. Кількість лейкоцитів у 12 хворих була $5,4-31,0 \times 10^9/\text{л}$, а у 2 осіб було виявлено гіперлейкоцитоз – $111,6-220,0 \times 10^9/\text{л}$. Процентний вміст лімфоцитів у 13 пацієнтів перевищував 70%. Наявність РПГ на основі збільшення діаметру селезінкової та ворітної вен встановили у 4 пацієнтів. У 6 пацієнтів I групи число тромбоцитів становило від поодиноких в препараті до $99,8 \times 10^{12}/\text{л}$ (IV стадія ХЛЛ за Rai); у 2 із них були прояви геморагічного синдрому у вигляді гематом і петехій.

Всім пацієнтам цієї групи перед операцією проводили лікування кортикостероїдними препаратами та хіміотерапію, проте ефект виявився короткотривалим. Таким чином, показаннями до операції у хворих на ХЛЛ з АІГА були такі: спленомегалія, автоімунна гемолітична анемія, гемолітичні кризи, абдомінальний синдром, регіональна портальна гіпертензія, неефективність хіміо- та кортикостероїдної терапії, тромбоцитопенія.

Після лапаротомії у всіх пацієнтів було підтверджено масивну спленомегалію, абдомінальну лімфаденопатію ($n=9$), РПГ у вигляді варикозно-розширених вен шлунка, діафрагми, великого сальника та селезінкової вени ($n=4$); в одного пацієнта в черевній порожнині виявилось приблизно 400 мл асцитичної рідини. Перебіг операції у 7 пацієнтів ускладнювали периспленічні злуки (в основному, між селезінкою та діафрагмою), підвищену кровоточивість під час операції спостерігали у 2 хворих (IV ст. за Rai). Операційна крововтрата становила 150–300 мл, у 2 випадках перевищувала 500 мл. Трьом пацієнтам

були виконані симультанні операції: ліквідація пупкової грижі ($n=2$), холецистектомія ($n=1$). Маса видалених селезінок дорівнювала 2,5-5,5 кг.

Спленектомія виявилась ефективною у 12 (85,7%) хворих на ХЛЛ з АІГА: видалено великий масив пухлини, усунуто абдомінальний дискомфорт, припинився гемоліз, значно покращився загальний стан пацієнтів. У хворих з анемією нормалізувався або виріс рівень гемоглобіну, при гіперлейкоцитозі зменшилась кількість лейкоцитів, абсолютне число лімфоцитів знизилось майже в 2 рази, а в 6 випадках, навпаки, зросло, хоча кількість лімфоцитів у 2 випадках значно знизилась. У пацієнтів на ХЛЛ IV ст. за Rai з АІГА число тромбоцитів нормалізувалось ($n=5$) або зросло ($n=1$), при цьому геморагічний синдром було ліквідовано.

Безпосередньо після операції (10-16 доба) у 4 (28,6%) хворих I групи ми спостерігали такі ускладнення: гостра надниркова недостатність ($n=2$), лівобічний ексудативний плеврит ($n=1$), некроз країв післяопераційної рани ($n=1$). Один пацієнт із III ст. хвороби за Rai помер на 3 добу після операції внаслідок гострої надниркової недостатності.

При аналізі віддалених результатів спленектомії у хворих на ХЛЛ з супутньою АІГА встановлено: медіана безподійного виживання (EFS) дорівнювала 12,0 міс. при терміні спостереження 1-26 міс., а медіана загального виживання (OS) була 25,5 міс. (термін спостереження 2-256 міс.), з 2-річним виживанням – 4 (33,3%) хворих, 5-річним – 1 (8,3%) і 10-річним – 2 (16,7%) пацієнтів. Середній час виживання після спленектомії у пацієнтів з III ст. за Rai становив 77,6 міс., а з IV ст. – 54,5 міс. У 8 (57,1 %) хворих через 1-14 міс. після спленектомії розпочато хіміотерапевтичне лікування, а один пацієнт – живе після операції 256 міс. без допоміжної терапії, хоча скаржиться на часті гострі респіраторні інфекції. Після спленектомії через 2-32 міс. померло 8 (57,1%) хворих на ХЛЛ з АІГА. Причиною смерті 7 пацієнтів було прогресування основного захворювання, причому рецидив гемолізу спостерігали тільки в одному випадку. Один пацієнт помер через 26 міс. після операції внаслідок

OPSI-синдрому (синдром неподоланої постспленектомічної інфекції), який протікав з клінікою тяжкого септичного шоку.

Спленектомію виконано у 10 хворих на НГЛ, ускладнену АІГА з тепловими антитілами. Серед них було 6 чоловіків і 4 жінки віком 25-68 років (медіана – 51,5 р.). Пацієнти, крім одного, перебували в задовільному клінічному стані із скаргами на загальну слабкість, підвищену втомлюваність і втрату ваги (1-2 ступінь за шкалою ECOG). Тривалість хвороби до спленектомії становила від 1 до 48 міс. Збільшення периферичних лімфовузлів відзначали у 4 пацієнтів, медіастинальних – у 2, а внутрішньочеревні були збільшені у всіх хворих. У всіх випадках констатовано спленомегалію, причому у 4 пацієнтів селезінка займала всю ліву половину живота, а у 2 хворих – цілий живіт і нижнім полюсом опускалась в малий таз. Гепатомегалію (печінка 1-6 см з-під краю реберної дуги) спостерігали у 5 пацієнтів цієї групи. Ураження кісткового мозку (>30% лімфоїдних клітин) виявлено у 3 хворих з лімфоцитозом периферичної крові $>10,0 \times 10^9/\text{л}$ в 2 випадках. В протеїнограмі у одного пацієнта з нодулярною лімфомою маргінальної зони (NMZL) наявний М-градієнт.

У всіх хворих були ознаки посиленого гемолізу: жовтяничність шкіри та слизових, анемія (у 8 пацієнтів гемоглобін 60-96 г/л), ретикулоцитоз 20-128%, які супроводжувалися підвищенням рівня загального білірубіну за рахунок непрямой фракції та, в окремих випадках, трансаміназ, позитивний прямий тест Кумбса та теплові аглютиніни. Лейкопенію ($1,0-3,5 \times 10^9/\text{л}$) виявлено у 4 хворих. В одному випадку гемоліз став першим проявом недуги, а в решти приєднувався після маніфестації НГЛ. Абдомінальні прояви (відчуття дискомфорту і болі в лівому підребер'ї) відзначено у 5 хворих. Наявність РПГ сонографічно діагностовано у 5 пацієнтів.

До операції 6 хворих лікували кортикостероїдними препаратами, проводили хіміотерапію, трансфузії відмитих еритроцитів, що не приводило до припинення гемолізу. Таким чином, показаннями до спленектомії у хворих на

НГЛ з АІГА були: посилений гемоліз, який не піддавався медикаментозній корекції, лейкопенія як можливий прояв гіперспленізму, масивна спленомегалія з абдомінальними симптомами, наявність РПГ.

Операція спленектомії у 3 хворих супроводжувалась крововтратою >500 мл внаслідок великих розмірів селезінки, периспленіту, підвищеної кровоточивості та РПГ. В решті випадків (7 хворих) операція пройшла без ускладнень з крововтратою <500 мл. У 3 пацієнтів у черевній порожнині була наявна асцитична рідина. Маса видалених селезінок становила від 1,5 кг до 10 кг. В усіх пацієнтів I групи підтверджено абдомінальну лімфаденопатію: у 3 хворих спостерігали збільшені лімфовузли тільки у воротах селезінки, а у решти 7 пацієнтів – виявили пакети лімфовузлів по малій та великій кривині шлунка, в гепатодуоденальній зв'язці, у воротах печінки та нирки, по верхньому краю підшлункової залози та брижові. В одного хворого видалено 2 додаткові селезінки, іншій пацієнтці виконано одночасно холецистектомію з приводу хронічного калькульозного холециститу.

При гістологічному та імуногістохімічному дослідженні видалених селезінок (в тому числі 2 додаткових) та абдомінальних лімфовузлів у 5 хворих підтверджено початковий діагноз варіанту НГЛ. У інших 5 пацієнтів без доступних для морфологічного дослідження уражених периферичних лімфовузлів і/або лейкомізації встановлено або уточнено варіант лімфоми, що вказує на діагностичне значення спленектомії у цих хворих.

Ускладнення в післяопераційному періоді виникли у 2 (20%) пацієнтів. В одній хворій виникла двобічна пневмонія, яка була вилікувана після призначення адекватної антибактеріальної терапії. В іншого хворого появився тромбофлебіт поверхневих варикозних вен нижньої кінцівки на ґрунті постспленектомічного гіпертромбоцитозу; йому проведено тромбвенекутомію. Безпосередній результат спленектомії у всіх (100%) хворих на НГЛ з АІГА був добрим: припинився гемоліз, піднявся рівень гемоглобіну, у пацієнтів з лейкопенією нормалізувалась кількість лейкоцитів, концентрація білірубину

знизилась до норми, зник М-градієнт, відсутні прояви абдомінального дискомфорту. Протягом першого року після операції тільки один (10%) хворий І групи потребував цитостатичного лікування.

При аналізі віддалених результатів спленектомії у хворих на НГЛ з АІГА встановлено, що EFS дорівнювала 29,0 міс. [12,0-49,0 міс.], а OS – 31,0 міс. [18,1-52,2 міс.] з 3-річним виживанням 45% хворих і 5-річним – 22%. Найкоротшу тривалість життя після операції (3 міс.) констатовано у пацієнта з нодальною лімфомою маргінальної зони (NMZL), а найкращий результат отримано при зрілоклітинній В-НГЛ (низького ступеня злоякісності за WF). Пацієнт живе 206 міс. після спленектомії в стані повної клінічної ремісії, без будь-якого лікування.

Один хворий на SMZL (оперований, коли була відсутня можливість вакцинальної профілактики) помер через 9 міс. після спленектомії внаслідок OPSI-синдрому, який перебігав з клінічною картиною септичного шоку. Антибіотикотерапія і реанімаційні заходи у відділенні інтенсивної терапії виявилися безуспішними, хворий помер. Пацієнти з дифузною В-великоклітинною лімфомою (DLBCL; 6 осіб), незважаючи на добрі безпосередні результати спленектомії, мали невисоку медіану загального виживання – 26 міс., причому 5 з них померли від прогресування лімфоми, а одна хвора – від інфаркту міокарда через 64 міс. після операції.

За останні 20 р. значно зросли можливості хіміотерапевтичного лікування при хронічних лімфопроліферативних неоплазіях, проте наявність АІГА надалі вважається несприятливим прогностичним фактором [9]. Якщо при ХЛЛ автоімунний процес у 82-83% [6] випадків відповідає на кортикостероїди та хіміотерапевтичні засоби, то при НГЛ, особливо при окремих її варіантах, часто доводиться розраховувати тільки на цитостатики [4]. Питання необхідності операційного лікування виникає у випадку масивної спленомегалії з усіма наслідками (абдомінальний дискомфорт, регіональна портальна гіпертензія, гіперспленізм). При ХЛЛ кількість спленектомій

останнім часом суттєво знизилась, проте за наявності супутньої АІГА і неефективності кортикостероїдів, а також підвищеній токсичності хіміопрепаратів в частини пацієнтів спленектомія залишається актуальною навіть як перша лінія лікування [6].

Всі автори відзначають добрі безпосередні результати спленектомії при хронічних лімфопрліферативних неоплазіях, асоційованих з АІГА: клініко-гематологічна ремісія, як правило, настає у 85-90% випадків [7, 11] при летальності 0-6 % [3, 8]. Серйозну проблему становить відносно висока частота післяопераційних ускладнень. В основному, це геморагічні, тромботичні та інфекційно-запальні ускладнення [1, 2, 3]. Причинами їх виникнення, як вважають, є наявність у пацієнта агресивної онкогематологічної пухлини, супутньої цитопенії, великої в периспленічних злуках селезінки, регіональної портальної гіпертензії, післяопераційного гіпертромбоцитозу. Найгрізніше післяопераційне ускладнення, яке ми спостерігали – це гостра надниркова недостатність, яка виникла у 2 пацієнтів з ХЛЛ: 1 хворий помер, у іншій пацієнтки стан вдалося стабілізувати. Причиною такого ускладнення може стати не тільки недостатність стероїдних гормонів в організмі, а й ураження наднирників злоякісним процесом.

Протягом першого року після операції тільки один (10 %) хворий на НГЛ потребував цитостатичного лікування, натомість при ХЛЛ 7 (50%) пацієнтам було призначено хіміо- та кортикостероїдну терапію. Відповідно EFS була більш ніж у 2 рази вищою при НГЛ, а OS, як вже було зазначено, при ХЛЛ дорівнювала 25,5 міс., а при НГЛ – 31,0 міс. Слід зазначити, що рецидиви хвороби, які виникають після спленектомії при НГЛ жодного разу не супроводжувалися гемолізом, а при ХЛЛ – гемоліз було виявлено лише в одному випадку.

Таким чином, незважаючи на відносно високий ступінь хірургічної агресії, спленектомія залишається важливим методом лікування при хронічних лімфопрліферативних неоплазіях, ускладнених АІГА.

Висновки

1. Спленектомія надалі залишається методом лікування хронічних лімфопроліферативних неоплазій, ускладнених автоімунною гемолітичною анемією, резистентною до терапії кортикостероїдними та цитостатичними препаратами.

2. Додатковими показаннями до спленектомії при лімфоїдних неоплазіях є масивна спленомегалія, яка супроводжується явищами абдомінального дискомфорту та регіональною портальною гіпертензією.

3. Позитивний результат операції (припинення гемолізу, абдомінального дискомфорту, зменшення проявів регіональної портальної гіпертензії, зниження потреби у цитостатичній та кортикостероїдній терапії) досягнуто у 85,7% хворих на ХЛЛ і 100% хворих на НГЛ.

4. Післяопераційні ускладнення після спленектомії виникли у 28,6% хворих на ХЛЛ і 20% хворих на НГЛ.

5. Віддалені результати спленектомії кращі у хворих на НГЛ. При ХЛЛ менша медіана загального виживання і швидше настає потреба в цитостатичному лікуванні. Рецидив гемолізу спостерігали лише у одного пацієнта з ХЛЛ.

Література

1. Splenectomy for non-Hodgkin's lymphoma. / Brodsky J., Abkar A., Styler M. // Am J Clin Oncol. – 1996. – Vol. 19, no 6. – P. 558-561.

2. Portal vein thrombosis following splenectomy for hematologic disease: prospective study with Doppler color flow imaging. / Chaffanjon P. C., Brichon P. Y., Ranchoup Y. [et al.] // World J Surg. – 1998. – Vol. 22, no 10. – P. 1082-1086.

3. Splenectomy for hypersplenism in chronic lymphocytic leukaemia and malignant non-Hodgkin's lymphoma. / Delpero J. R., Houvenaeghel G., Gastaut J. A. [et al.] // Br J Surg 1990. – Vol. 77, no 8. – P. 957.

4. Autoimmune hemolytic anemia, Evans' syndromes, and pure red cell aplasia in non-Hodgkin lymphomas. / Hauswirth A. W., Skrabbs C., Schutzinger C. [et al.] // Leuk Lymphoma. – 2007. – Vol. 48, no 6. – P. 1139-1149.

5. Guidelines on the management of drug-induced immune and secondary autoimmune, haemolytic anaemia/ / Hill Q., Stamps R., Massey E. [et al.] // Br J Haematol. – 2017. – Vol. 177. – P. 208-220.

6. Lechner K. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. / Lechner K., Jager U. // Blood. – 2010. – Vol. 116, no11. – P. 1831-1838.

7. Majumdar G. Role of splenectomy in chronic lymphocytic leukemia with massive splenomegaly and cytopenia. / Majumdar G., Singh A. K. // Leuk Lymphoma. – 1992. – Vol. 1-2. – P. 131

8. Splenectomy in advanced for chronic lymphocytic leukemia: a single institution experience with 50 patients. / Neal T. F. Jr., Tefferi A., Witzig T. E. [et al.] // Am J Med. – 1992. – Vol. 93, no 4. – P. 435-440.

9. Autoimmune hemolytic anemia in patients with non-Hodgkin's lymphoma: characteristics and significance. / Sallah S., Sigounas G., Vos P. [et al.] // Ann Oncol. – 2000. – Vol. 11, no 12. – P. 1571-1577.

10. Sallah S. Future development of lymphoproliferative disorders in patients with autoimmune hemolytic anemia. / Sallah S. , Wan J. Y., Hanrahan L. R. // Clin Cancer Res. – 2001. – Vol. 7, no 4. – P. 791-794.

11. Splenectomy in patients with malignant non-Hodgkin's lymphoma. / Xiros N., Economopoulos T., Christodoulidis C. [et al.] // Eur J Haematol. – 2000. – Vol. 64, no 3. – P. 145-150.

Надійшла 10.11.2017 року

УДК: 576.312.36+616.155.392.2-037-071

**ДІАГНОСТИЧНЕ ТА ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ СПРИЯТЛИВИХ
ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІСЛОЇДНУ
ЛЕЙКЕМІЮ**

О. В. Зотова¹, А. С. Лук'янова¹, М. О. Вальчук¹, І. С. Ванько¹, С. В. Осідач¹,
М. М. Римар¹, Ю. С. Кароль², В. Є. Логінський¹

¹ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів;

²Комунальна 5 міська клінічна лікарня, Львів

Резюме. Цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку та/або периферичної крові проведено у 105 хворих на гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ). Хромосомні аномалії різного характеру виявлено у 57% хворих. З урахуванням аналізу каріотипу хворих класифіковано на три групи ризику: група хворих з несприятливими цитогенетичними маркерами, група проміжного ризику без прогностично значущих маркерів та група зі сприятливими факторами прогнозу. До групи ГМЛ із сприятливим клінічним прогнозом увійшли випадки із збалансованими хромосомними аберациями – $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$ та $inv(16)(p13q22)$. Цитогенетичні методи повинні бути включені у стандарти обстеження хворих на ГМЛ для діагностики, прогнозування перебігу та підбору оптимальної тактики лікування.

Ключові слова: гостра мієлоїдна лейкемія, сприятливі цитогенетичні маркери, каріотип, цитогенетична аберация, діагноз, прогноз.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF FAVORABLE CYTOGENETIC PROGNOSTIC MARKERS IN PATIENS WISH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

O. Zotova¹, A. Lukyanova¹, M. Valchuk¹, I. Vanko¹, S. Osidach¹,
M. Rymar¹, Y. Karol², V. Loginsky¹

¹SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine», Lviv;

²Communal Clinical Hospital № 5, Lviv

Summary. A cytogenetic analysis of bone marrow and/or peripheral blood cells from 105 patients with acute myeloid leukemia (AML) was performed. Chromosomal abnormalities of various kinds were found in 57% of the patients. According to the karyotype analysis patients were classified by risk groups: the group of patients with unfavorable cytogenetic markers, the intermediate risk group without significant prognostic markers and the group with favorable prognostic factors. Cases with balanced chromosomal aberrations – $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$ and $inv(16)(p13q22)$ were included to the group of AML with favorable clinical prognosis. Thus, cytogenetic methods should be included in the standard examination of patients with AML for diagnosis, prognosis and selection the optimal treatment strategy.

Key words: acute myeloid leukemia, favorable cytogenetic markers, karyotype, cytogenetic aberration, diagnosis, prognosis.

Вступ. Гострі мієлоїдні лейкемії характеризуються дуже різноманітним клінічним перебігом і різною чутливістю до терапії. Ключова подія у розвитку гострих ГМЛ – перебудови геному клітин-попередників. На сучасному рівні знань стала очевидною потреба переоцінки відомих прогностичних критеріїв, що базуються, переважно, на клінічних та рутинних гематологічних тестах і набула актуальності проблема розробки нових прогностичних систем, що паралельно із загальноприйнятими дослідженнями, враховували б найбільш специфічні ознаки патологічних клонів: геном клітин лейкемічного клону та його аномалії. Пошкодження геному лейкемічних клітин в основному представлені хромосомними перебудовами (транслокації, інверсії, делеції, моносомії, додаткові копії хромосом та ін.) і можуть бути виявлені за допомогою методів класичної цитогенетики та молекулярно-генетичних методів. Хромосомні аномалії різного характеру виявляються у 50-60% дорослих хворих на ГМЛ. Спектр генетичних перебудов при цих недугах має важливе діагностичне та прогностичне значення. На підставі дослідження каріотипу хворого встановлюється група ризику перебігу хвороби, а також підбирається ефективна схема лікування. За прогностичним значенням хромосомних перебудов виділяють три основні групи хворих на ГМЛ: з несприятливими цитогенетичними маркерами, проміжного ризику та з сприятливими факторами прогнозу. До останньої групи відносять випадки ГМЛ із збалансованими хромосомними абераціями – $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$, $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ [2, 4, 8].

Метою роботи була оцінка діагностичного та прогностичного значення перебудов каріотипу у хворих на ГМЛ, зокрема $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$ та $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$.

Матеріали і методи дослідження. Цитогенетичні дослідження злоякісних клітин проведено у 105 пацієнтів з ГМЛ. Діагноз у хворих встановлено на основі клініко-гематологічних, цитологічних та імунофенотипових досліджень. Обстежено хворих віком від 18 до 84 років,

серед них 62 чоловіка і 43 жінки.

Зразки бластних клітин від хворих отримували шляхом аспіраційної біопсії кісткового мозку та під час венопункції. Використовували загальноприйнятий метод 24- та 48-годинного культивування клітин кісткового мозку та/або периферичної крові *in vitro*. Обробку клітин проводили за загальноприйнятою методикою, яка включала дію колхіцину, гіпотонізацію, фіксацію і приготування препаратів. Аналіз метафазних хромосом проводили із застосуванням G-методики диференційного забарвлення фарбою Райта [1, 3, 12]. Забарвлені препарати аналізували при збільшенні $\times 1000$ під світловим мікроскопом Olympus BX41 (Olympus, Японія) з використанням системи для хромосомного аналізу CytoVision (Applied Imaging, Великобританія). Проводили аналіз не менше 10 метафазних пластинок. Лише в одному випадку було проведено дослідження меншої кількості метафаз внаслідок низької мітотичної активності пухлинних клітин. При аналізі та описі каріотипу дотримувались критеріїв *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* – ISCN, 2009 [10].

У частині випадків мітози були відсутні або ж їх якість незадовільна. За відсутності придатних до аналізу метафазних пластинок додатково застосовували метод флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) з відповідними мітками. Підготовку препаратів та процедуру гібридизації здійснювали за Pinkel et al. [9] з урахуванням рекомендацій виробника мітки. Аналізували не менше 200 клітин.

Результати та їх обговорення. Дослідна група включила 105 пацієнтів. У цій групі аномальний каріотип виявлено у 53 (50%) випадках. Серед них: у 17 хворих встановлено наявність множинних змін каріотипу (≥ 3), у 9 пацієнтів – двох перебудов у каріотипі та у 27 – однієї перебудови. У 7 хворих (2 випадки ГМЛ з нормальним каріотипом та 5 випадків ГМЛ без придатних для аналізу метафазних пластинок) дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RARa*. Загалом, у 60 (57%) з 105 обстежених пацієнтів спостерігали

різного характеру цитогенетичні перебудови. У зразках, отриманих від 45 (43%) хворих, виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін.

Отримані результати цитогенетичного аналізу дозволили розподілити пацієнтів з ГМЛ на три групи ризику перебігу хвороби. Перша група включила 25 хворих на ГМЛ з несприятливим цитогенетичними маркерами (перебудови 3q, -5, -7, del(5q), del(17p), t(9;22)(q34;q11), комплексний каріотип (≥ 3 аномалій)). До другої групи ввійшли 62 пацієнти, у яких не було виявлено прогностично значущих цитогенетичних маркерів. Це група з проміжним або нез'ясованим прогнозом, до її складу включено хворих на ГМЛ з нетиповими або рідкісними хромосомними абераціями та з нормальним каріотипом. Третя група об'єднала 18 хворих на ГМЛ зі сприятливими факторами прогнозу – ГМЛ з t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11-21), inv(16)(p13q22).

Серед 105 обстежених хворих прогностично сприятливі цитогенетичні аберації виявлено у 18 пацієнтів, а саме: t(15;17)(q22;q11-21) та/або ген *PML/RAR α* (12 випадків), t(8;21)(q22;q22) (5 випадків), inv(16)(p13q22) (1 випадок). Для виявлення цих перебудов у 10 хворих застосовано класичний цитогенетичний метод, у 5 хворих – тільки метод FISH та у 3 – як аналіз каріотипу, так і метод FISH.

Транслокацію t(15;17)(q22;q11-q21) виявлено у 5 випадках (рис. 1). У 4 пацієнтів це була єдина перебудова у каріотипі, у одного хворого, крім t(15;17)(q22;q11-q21), виявлено додаткову аберацію – тетрасомію хромосоми 8. У 2 пацієнтів виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін, однак дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RAR α* (рис. 2). В 5 хворих у зв'язку з відсутністю в дослідженому матеріалі придатних для аналізу метафазних пластинок виконано лише дослідження FISH, яке показало наявність химерного гена *PML/RAR α* . Загалом у 12 пацієнтів спостерігали наявність транслокації t(15;17)(q22;q11-21) та/або гена *PML/RAR α* .

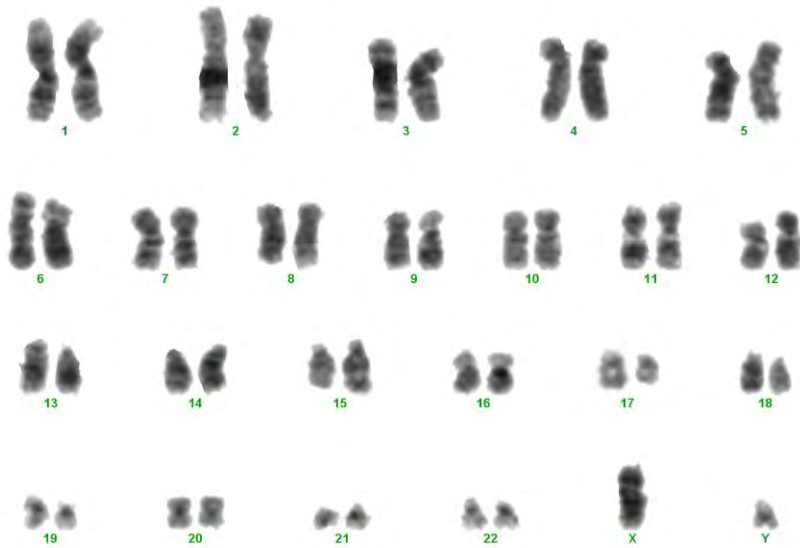


Рис. 1. Транслокація $t(15;17)(q22;q11-21)$.

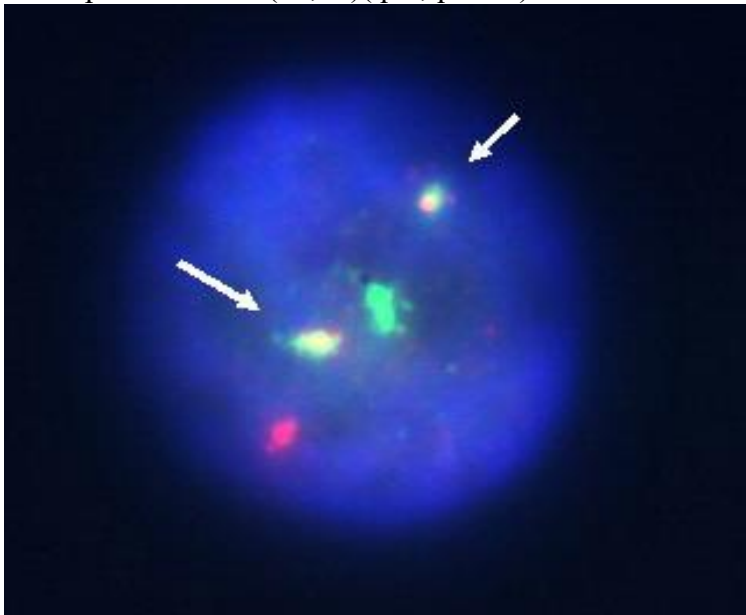


Рис. 2. Результат FISH-аналізу на інтерфазних ядрах для виявлення гена *PML/RARα* із застосуванням флуоресцентної мітки PML/RARα DC DF (Vysis).

Транслокацію $t(8;21)(q22;q22)$ виявлено у 5 хворих (рис. 3). В одного з них це була єдина перебудова в каріотипі. У 4 хворих, крім $t(8;21)(q22;q22)$, спостерігали додаткові зміни – відсутність Y-хромосоми (2 випадки) (рис. 3), делецію довгого плеча 9 хромосоми $del(9)(q21-22)$ (1 випадок), комплексний каріотип (1 випадок).

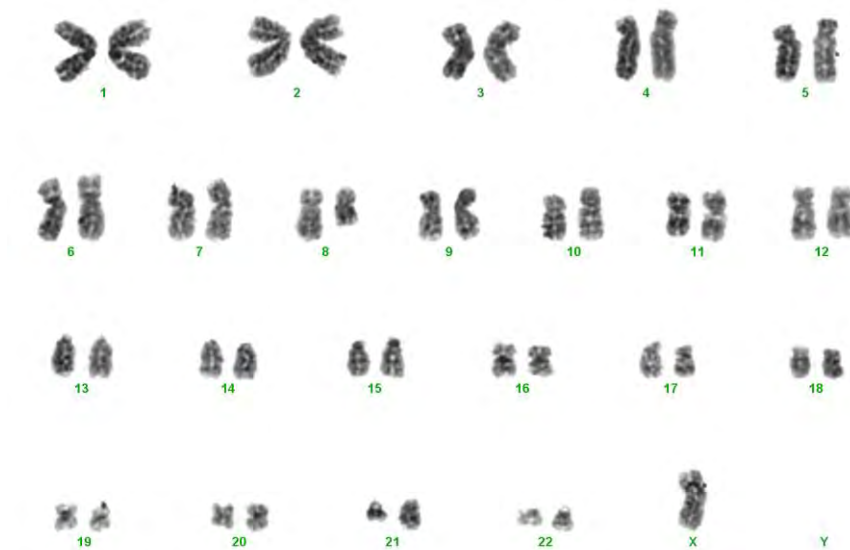


Рис. 3. Транслокація (8;21)(q22;q22), відсутність Y-хромосоми.

Інверсію 16 хромосоми $inv(16)(p13q22)$ виявлено в одному випадку, крім якої також спостерігали наявність додаткової перебудови в каріотипі – трисомії хромосоми 10 (рис. 4). Транслокації $t(16;16)(p13;q22)$ не виявлено у жодного з обстежених хворих.



Рис. 4. Інверсія 16 хромосоми $inv(16)(p13q22)$, трисомія 10 хромосоми.

За повідомленнями літератури при цитогенетичному дослідженні злоякісних клітин клональні хромосомні аномалії різного характеру

виявляються у 50-60% дорослих хворих на ГМЛ [2, 8]. Слід зазначити, що в дослідній групі (105 пацієнтів) аномалії каріотипу спостерігали у 57% хворих на ГМЛ, і цей показник збігається з даними літератури.

Транслокація $t(15;17)(q22;q11-21)$ та відповідні химерні гени *PML/RARa* і *RARa/PML* строго специфічні для гострої промієлоцитарної лейкемії (ГПЛ; М3 варіант ГМЛ за FAB класифікацією), їх виявляють у 91-95% усіх хворих на ГПЛ. Утворення химерного гена *PML/RARa* та відповідного химерного білка *PML/RARa* відіграє ключову роль в патогенезі ГПЛ. Внаслідок цього зупиняється нормальне дозрівання промієлоцитів. Виявлення вищевказаної перебудови у хворих на ГМЛ передбачає включення у схеми поліхіміотерапії диференціального агента – повної *транс*-ретиноевої кислоти (АТРА). Відкриття цільової дії АТРА стало ключовою подією у лікуванні ГПЛ, яку до того вважали фатальною хворобою. За надлишку АТРА молекула химерного білка *PML/RARa* модифікується, а диференціація клітин відновлюється. Використання АТРА значно поліпшило результати лікування ГПЛ: в 70-90% випадків вдається досягнути багаторічної ремісії. В 29-37% випадків, крім $t(15;17)(q22;q11-21)$, спостерігають додаткові хромосомні аномалії, а саме – трисомію 8, $del(9q)$, ізодериват хромосоми 17 [5, 6, 7]. Ми виявили лише в 1 (8%) із 12 обстежених пацієнтів додаткову аномалію (тетрасомію 8 хромосоми), оскільки каріотипування було проведене не у всіх пацієнтів у зв'язку з відсутністю придатних для аналізу метафазних пластинок. Описано, що наявність таких додаткових аномалій, як трисомія 8 та ізодериват 17 хромосоми, на прогноз перебігу хвороби не впливає, тоді як $del(9q)$ – погіршує прогноз [5, 6].

Транслокація $t(8;21)(q22;q22)$ виявляють у 7% випадків ГМЛ та у 40% пацієнтів з М2 варіантом ГМЛ за FAB класифікацією. Внаслідок вказаної транслокації утворюється химерний ген *AML1/ETO* та відповідний химерний білок *AML1/ETO*, який блокує процес транскрипції та зупиняє нормальне дозрівання клітин. В 40% випадків, крім $(8;21)(q22;q22)$, спостерігають

додаткові аномалії, а саме – втрату X- або Y-хромосоми, делецію довгого плеча 9 хромосоми del(9q), додаткові копії хромосом 8 і 21 та ін. [7, 11]. Так, у 4 (80%) із 5 хворих з t(8;21)(q22;q22), ми спостерігали додаткові аномалії – втрату Y-хромосоми (2 випадки), делецію довгого плеча 9 хромосоми del(9)(q21-22) (1 випадок), множинні зміни каріотипу (1 випадок). За повідомленнями літератури відсутність Y-хромосоми не впливає на прогноз перебігу захворювання. У групі хворих з делецією del(9q) відзначено збільшену в 2 рази частоту рецидивів [7, 11].

Аномалії інверсія inv(16)(p13q22) та транслокація t(16;16)(p13;q22) специфічні для М4 варіанту ГМЛ за FAB класифікацією. Інверсія 16 хромосоми характерна для третини хворих на цей варіант ГМЛ. Транслокацію t(16;16)(p13;q22) виявляють значно рідше. В результаті вищевказаних перебудов утворюється химерний ген *CBFB/MYH11* та відповідний химерний білок CBFB/MYH11, який блокує процес транскрипції та зупиняє нормальне дозрівання нейтрофілів. У половині випадків, крім inv(16)(p13q22), також спостерігають додаткові перебудови – додаткові копії хромосом 8, 21 та 22 [5, 7]. У обстеженого пацієнта з inv(16)(p13q22), крім інверсії 16, ми спостерігали додаткову копію 10 хромосоми.

Семеро хворих на ГМЛ із сприятливими цитогенетичними маркерами померли раптово, 5 хворих – перебувають в ремісії, ще 6 хворих – продовжують лікування. У 4 хворих на ГМЛ в якості індукційної та підтримуючої терапії було застосовано АТРА в поєднанні з антрациклінами, що дозволило швидко досягти ремісії з тривалим періодом безрецидивного виживання. Це підтверджує сприятливість транслокації t(15;17)(q22;q11-q21) при включенні АТРА в схеми лікування ГМЛ, що збігається з даними літератури [2, 7].

Висновки

Цитогенетичні дослідження дозволили виявити асоційовані з ГМЛ цитогенетичні аномалії у 57% хворих. На основі аналізу каріотипу хворих

класифіковано на групи ризику: група хворих з несприятливими цитогенетичними маркерами, група середнього ризику з маркерами проміжного прогнозу та група із сприятливими факторами прогнозу. До групи ГМЛ із сприятливим клінічним прогнозом включено випадки із збалансованими хромосомними абераціями – $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$ та $inv(16)(p13q22)$. Розподіл пацієнтів на прогностичні групи дозволяє підібрати найоптимальнішу тактику їх лікування. Таким чином, встановлено високу інформативність цитогенетичних методів дослідження для діагностики, прогнозування перебігу та підбору тактики лікування ГМЛ, що свідчить про необхідність їх включення до переліку обов'язкових методів обстеження хворих на ГМЛ.

Література

1. Андреева С. В. Стандарты анализа препаратов хромосом при неоплазиях кровотообразования (методичні рекомендації) / С. В. Андреева, В. Д. Дроздова. – Київ, 2007. – 44 с.
2. Ольшанская Ю. В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах / Ю. В. Ольшанская, Е. В. Домрачева. – Москва: МЕДпресс-информ, 2006. – 112 с.
3. Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematoonkologicznych (poradnik) / В. Pieńkowska-Grela, J. Brycz-Witkowska, E. Chmarzyńska-Mróż [i wsp.]. – Warszawa: Centrum Onkologii, 2004. – 59 s.
4. Bain B. J. Leukaemia diagnosis. 4th edn / B. J. Bain. – NY: Wiley-Blackwell, 2010. – 403 p.
5. Balanced chromosome abnormalities $inv(16)$ and $t(15;17)$ in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an International Workshop. Gen. Chromosom. / M.K. Andersen, R.A. Larson, N. Mauritzson, et al. // Cancer. – 2002. – Vol. 33, № 4. – P. 395-400.
6. Cytogenetic analysis and FISH of terminal deletion of the long arm of chromosome 9 in a patient with acute promyelocytic leukemia / G. Vasquez-Palacio,

O. Botero, M. Sierra, et al. // *Medicina Universitaria*. – 2009. – Vol. 11, № 44. – P. 193-197.

7. Heim S. *Cancer cytogenetic*. 3rd edn. / S. Heim, F. Mitelman. – NY: Wiley-Blackwell, 2009. – 736 p.

8. Mrozek K. *Cytogenetics in acute leukemia* / K. Mrozek, N. A. Heerema, C. D. Bloomfield // *Blood Rev.* – 2004. – Vol. 18. – P. 15-36.

9. Pinkel D. *Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization* / D. Pinkel, T. Straume, J. W. Gray // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 83. – P. 2934-2938.

10. Shaffer L. S. *ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* / L. S. Shaffer, M. L. Slovak, L. J. Campbell. – Basel: S. Karger, 2009. – 138 p.

11. The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, specifically represses the transcription of the p14ARF tumor suppressor in acute myeloid leukemia / B. Linggi, C. Muller-Tidow, L. van de Locht [et al.] // *Nature Medicine*. – 2002. – Vol. 8, № 7. – P. 743-750.

12. Wang H. C. *Banding in human chromosomes treated with trypsin* / H.C. Wang, S. Fedoroff // *Nat. New Biol.* – 1972. – Vol. 235. – P. 52-53.

Надійшла 07.11.2017 року.

УДК:616-005.6-071+616-005.1-08

**ЛАБОРАТОРНІ КРИТЕРІЇ ДІАГНОСТИЧНОЇ ПРИДАТНОСТІ
РУТИННИХ КОАГУЛОЛОГІЧНИХ ТА ТЕСТІВ НА ВИЯВЛЕННЯ
ВОВЧАКОВОГО АНТИКОАГУЛЯНТУ У ПАЦІЄНТІВ З ПІДОЗРОЮ НА
АНТИФОСФОЛІПІДНИЙ СИНДРОМ**

В. В. Красівська, О. В. Стасишин

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Резюме. Метою дослідження був пошук найінформативніших коагулологічних тестів на виявлення вовчакового антикоагулянту (ВА) у пацієнтів з підозрою на антифосфоліпідний синдром (АФС) шляхом визначення діагностичних лабораторних

критеріїв придатності (специфічності, чутливості, ефективності та співвідношення правдивості) для кожного з цих тестів.

Матеріали і методи. У 233 пацієнтів з підозрою на наявність АФС загальний стан системи гемостазу оцінювали за допомогою рутинних тестів, наявність ВА досліджували на основі послідовного виконання трьохетапного комплексу тестів відповідно до сучасних рекомендацій.

Результати і висновки. АФС було діагностовано у 44,6% хворих. У групі пацієнтів з АФС ВА виявлено у 95,2% випадків. Окрім активованого часткового парціального часу (АЧТЧ) рутинні тести не можуть бути застосовані для виключення або підтвердження наявності ВА та слугувати ідентифікаторами захворювання. Жоден тест, використаний для діагностики ВА, не продемонстрував 100,0% чутливості і специфічності. Найвищу статистично достовірну діагностичну ефективність виявлено у тестах 3-го етапу на підтвердження фосфоліпід-залежної природи інгібітора, які можна вважати достатньо надійними для виявлення активності ВА та діагностики АФС.

Ключові слова: вовчаковий антикоагулянт, антифосфоліпідний синдром, діагностика, чутливість, специфічність.

LABORATORY CRITERIA FOR THE DIAGNOSTIC APPLICABILITY OF ROUTINE COAGULATION AND TESTS FOR DETECTION OF LUPUS ANTICOAGULANT IN PATIENTS WITH SUSPECTED ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

V. Krasivska, O. Stasyshyn

SI “Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine under the NAMS of Ukraine”, Lviv

Summary. *The aim of the study was to find the most informative coagulologic tests for the detection of lupus anticoagulant (LA) in patients with suspected antiphospholipid syndrome (APS) by identifying diagnostic laboratory eligibility criteria (sensitivity, specificity, accuracy and likelihood ratio) for each of these tests.*

Materials and methods. *In 233 patients with suspected APS, the general state of the hemostasis system was assessed by routine tests, the presence of LA was examined on the basis of a consistent implementation of a three-step test carried out in accordance with the current recommendations.*

Results and conclusions. *APS was diagnosed in 44,6% of patients. In the group of patients with APS, LA was detected in 95,2% of cases. Routine tests can not be used to exclude or confirm the presence of LA and serve as disease identifiers, except the activated partial thromboplastin time (APTT). None of the tests used to diagnose LA showed 100,0% sensitivity and specificity. Statistically, the highest significant diagnostic efficacy was found in the 3-step tests to confirm the phospholipid-dependent nature of the inhibitor, which can be considered sufficiently reliable for detecting LA activity and diagnosing APS.*

Key words: *lupus anticoagulant, antiphospholipid antibodies, diagnosis, sensitivity, specificity.*

Вступ. Антифосфоліпідний синдром (АФС) – це набуте аутоімунне захворювання, яке характеризується гіперпродукцією антифосфоліпідних

антитіл (АФЛА) і клінічно проявляється тромбозами та/або ускладненнями вагітності [3, 6, 7, 9]. За міжнародними рекомендаціями до лабораторних критеріїв, що визначають пацієнтів з АФС, відносять підвищений вміст антикардіоліпінових антитіл (АКЛА) ізотопів IgG, IgM та/або анти- β 2-glycoprotein I антитіл (анити- β 2-GPI) ізотопів IgG, IgM та/або підвищений вміст вовчакового антикоагулянту (ВА). Діагноз АФС вимагає однієї клінічної та однієї лабораторної ознаки, підтвердженої з інтервалом 12 тижнів. АКЛА та анити- β 2-GPI антитіла виявляють за допомогою імуноферментних досліджень (ELISA), ВА діагностують, досліджуючи систему коагуляційного гемостазу [3, 5-7, 9]. Це зумовлено тим, що ВА є гетерогенною групою аутоантитіл, які *in vitro* перешкоджають процесу з'єднання та інгібують фосфоліпід-залежні реакції з'єднання. Виявлення активності ВА проводять згідно міжнародних керівництв, використовуючи трьохетапний алгоритм [4, 7, 10]. Але предметом дискусій все ще залишається послідовність етапів, кількість та набір необхідних тестів, склад реактивів та ін.. З іншого боку, лабораторні критерії діагностичної придатності рекомендованих тестів все ще досконало не досліджено, тому вивчення їх інформативності залишається актуальною проблемою.

Метою дослідження був пошук найінформативніших коагулологічних тестів на виявлення ВА у пацієнтів з підозрою на АФС шляхом визначення діагностичних лабораторних критеріїв придатності (специфічності, чутливості, ефективності та співвідношення правдивості) для кожного з цих тестів.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження були 233 пацієнти з підозрою на АФС (віком від 7 до 59 років, 213 жінки та 20 чоловіків), які протягом 2015-2016 років звернулись до ДУ «Інститут патолології крові та трансфузійної медицини НАМН України» із скаргами на тромбози різної локалізації, акушерською патологією (переважно із звичним невиношуванням вагітності), тромбоцитопенією (кількість тромбоцитів менше $100 \times 10^9/\text{л}$), псевдопозитивною реакцією Вассермана, різноманітними шкірними (сітчасте ліведо), неврологічними та серцевими порушеннями. Хворим було проведено

клінічні, клініко-генеалогічні, молекулярно-генетичні, цитологічні, цитогенетичні, гормональні, гематологічні, імунологічні, біохімічні та загальні коагулологічні дослідження. Для діагностики АФС за допомогою твердофазних імуноферментних методів (ELISA) визначали антикардіоліпінові антитіла (АКЛА) класів IgG, IgM, антитіла до $\beta 2$ -GPI класів IgG, IgM та проводили виявлення вовчакового антикоагулянту (ВА) на основі фосфоліпід-залежних коагулологічних методів.

Для коагулологічних досліджень плазму отримували і готували за стандартною процедурою [8]. Усі коагулологічні дослідження (рутинні та на виявлення ВА) виконували на напівавтоматичному коагулометрі Helena-C4 № С4-2489 (Helena Bioscience Europe, Велика Британія).

Для загальної оцінки стану системи гемостазу визначали протромбіновий час за Quick; (ПЧ), активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ), концентрацію фібриногену гравіметричним методом. Судинно-тромбоцитарний гемостаз оцінювали на підставі агрегації тромбоцитів під дією аденозиндифосфорної кислоти (АДФ) [8].

Дані нормальних показників системи гемостазу були отримані від 50 здорових осіб (25 чоловіків і 25 жінок середнього віку), які не приймали жодних ліків. Результати усіх коагулологічних досліджень порівнювали із розрахованим середнім арифметичним (m), референтний інтервал становив 2 стандартні відхилення ($m \pm 2SD$).

Діагностика ВА полягала у послідовному виконанні трьохетапного комплексу тестів для виявлення активності ВА відповідно до міжнародних критеріїв та сучасних рекомендацій [4, 7, 10]. На I-у етапі виконували скринінгові фосфоліпід-залежні коагуляційні тести: час зсідання з розведеною (час зсідання у контрольній плазмі 25-35 с) фосфоліпід-залежною отрутою змії гюрзи середньоазійської (ЛЧ), АЧТЧ із реагентом, що має високу чутливість до ВА (АЧТЧ_(ВА-чутл.)), ПЧ із розведеним тромбoplastином у 50 і 500 разів (ПЧ_(1:50), ПЧ_(1:500)). Для кожного скринінгового тесту розраховували індекс, як

відношення часу зсідання хворого до середнього референтного значення. Подовження індексу вказує на наявність патологічних інгібіторів (імунних до факторів зсідання або ВА) або на дефіцит прокоагулянту.

II-й етап діагностики ВА включав тести на змішування для виключення дефіциту коагуляційних факторів, що демонструють наявність інгібітора. Проводили корекцію подовженого часу зсідання скринінгового тесту нормальною плазмою у співвідношенні 1:1 з досліджуваною плазмою. Для кожного тесту розраховували індекс циркулюючого антикоагулянту (ІЦА) [4, 7, 8, 10]. Зростанні ІЦА більше $\geq 15,0\%$ вказувало на наявність ВА.

На III-у етапі виявлення ВА фосфоліпід-залежну природу інгібітору підтверджують доданням у систему надлишкової кількості фосфоліпідів. Ми застосовували відмиті, заморожені і розморожені тромбоцити донорів (лізат тромбоцитів), що змішували з плазмою пацієнта у рівних об'ємах. Процедуру приготування тромбоцитів та розрахунок нормалізованого співвідношення (НС) описано у літературі [4, 7, 8, 10]. Зростання НС $\geq 1,15$ підтверджувало наявність ВА [5].

Для оцінки придатності лабораторних тестів для виявлення ВА у пацієнтів із підозрою на АФС нами було використано наступні діагностичні критерії: специфічність, чутливість, ефективність та співвідношення правдивості для позитивного та негативного результатів застосованих коагулологічних тестів [1, 2].

Діагностичну чутливість (ДЧ) розраховували за формулою:

$$\text{ДЧ} = \frac{a}{a + c} \times 100\%,$$

де a - кількість істинно-позитивних результатів, $(a+c)$ - загальна кількість хворих осіб.

Діагностичну специфічність тесту (ДС) розраховували за формулою:

$$\text{ДС} = \frac{d}{b + d} \times 100\%,$$

де b – кількість істинно-негативних результатів у групі здорових осіб, $(b+d)$ – загальна кількість здорових осіб. Діагностична специфічність тесту повинна перевищувати 80,0% [1, 2].

Діагностична ефективність (ДЕ) відображає кількість правильних результатів серед усіх обстежених і розраховується за формулою:

$$ДЕ = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)} \times 100\%,$$

де a – кількість істинно-позитивних результатів, d – кількість істинно-негативних результатів, $(a+b+c+d)$ – загальна кількість усіх обстежених.

Для об'єднання чутливості і специфічності обраховували прогностичну цінність або співвідношення правдивості (СП). Формула розрахунку співвідношення правдивості для позитивного результату:

$$СП(+)= \frac{ДЧ(\%)}{100 - ДС(\%)}$$

Формула розрахунку співвідношення правдивості для негативного результату:

$$СП(-)= \frac{100 - ДЧ(\%)}{ДС(\%)}$$

СП(+)
показує вірогідність наявності хвороби у разі позитивного результату дослідження, а СП(-) – вірогідність, що пацієнт є здоровим у разі від'ємного (нормального) результату дослідження [1].

Статистичну обробку матеріалу виконали за допомогою пакетів прикладних програм STATISTICA for Windows 10,0 (Statsoft, USA). Для порівняння якісних характеристик (таблиці частот) застосовували критерій χ^2 у разі таблиць 2×2. Вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні достовірності не менше 95% ($p < 0,05$).

Результати і обговорення. Згідно міжнародних критеріїв 104 пацієнтам (44,6%) було встановлено діагноз АФС [3, 6, 7]. Первинний АФС діагностовано

у 89 (85,6%) хворих, у 15 (14,4%) виявлено вторинний АФС на тлі системного червоного вовчаку (СЧВ) та інших аутоімунних захворювань. ВА було діагностовано у 99 хворих, що становить 42,5% від обстежених та 95,2% від хворих з АФС. У групі пацієнтів з АФС медіана показників АФЛА серед обстежених пацієнтів не перевищувала норму (10,0 Од/мл).

Результати аналізу діагностичної чутливості, специфічності, ефективності та співвідношення правдивості для позитивного і негативного результату рутинних коагулологічних тестів у хворих з підозрою на АФС представлено у табл. 1. В загальному, усі рутинні тести мали низьку ДЧ і достатньо високу ДС.

Для ПЧ (П) чутливість становила 18,1% при специфічності 92,2% ($\chi^2=5,17$; $p<0,05$). АЧТЧ ($I_{AЧТЧ}$) виявляв дещо вищу ДЧ - 46,0% і найвищу зі всіх рутинних тестів ДС – 97,7% ($\chi^2=64,69$; $p<0,001$). ДЧ та ДС тесту кількості фібриногену становили 3,8% та 94,5% відповідно ($\chi^2=0,305$; $p>0,05$), агрегації тромбоцитів з агоністом АДФ – 30,8% та 81,4% відповідно ($\chi^2=4,18$; $p<0,05$). Завдяки низькій ДЧ рутинні методи дослідження гемостазу не дозволяють виявити хворих з ВА, дають багато псевдо-негативних результатів та не можуть бути застосовані на початкових етапах обстеження. З іншого боку, висока ДС цих методів рідко дає хибно-позитивні результати у осіб без ВА та при позитивному результаті підтверджує наявність антифосфоліпідної активності. Особливо це стосується АЧТЧ ($I_{AЧТЧ}$), за подовженим показником якого можна запідозрити наявність патологічного антикоагулянту. Як видно з табл.1, найвищу ДЕ (точність) серед всіх обстежених виявлено у тесті АЧТЧ ($I_{AЧТЧ}$) – 74,7%. Дещо нижчою була частка правильних результатів у тестах ПЧ (П) – 63,2%, кількості фібриногену – 59,8% та агрегації тромбоцитів з АДФ – 58,9%. При аналізі вірогідності співпадіння позитивного результату з заключним діагнозом найбільше СП (+) виявлено у тесті АЧТЧ ($I_{AЧТЧ}$) (20,0), що відображає високу ймовірність наявності ВА та АФС при подовженому часі зсідання цього тесту. Отже, частота позитивного результату АЧТЧ у хворих з ВА є у 20 разів більшою, ніж у осіб без антикоагулянту. З іншого боку, на

досить високу ймовірність наявності АФС при нормальному результаті АЧТЧ ($I_{\text{АЧТЧ}}$) вказує СП(-) 0,6 (табл.1). За показниками ПЧ (П), кількістю фібриногену та агрегації тромбоцитів з АДФ значення СП(+) становило 2,3, 0,7 та 1,7 відповідно. Розраховане СП(-) для ПЧ (П), кількості фібриногену та агрегації тромбоцитів з АДФ наближалось до 1,0, що свідчить про однакову ймовірність наявності або відсутності ВА при нормальних результатах цих тестів.

Таблиця 1 – Чутливість, специфічність, діагностична ефективність та співвідношення правдивості рутинних коагулологічних тестів у пацієнтів з підозрою на антифосфоліпідний синдром (АФС)

Тест	ДЧ, %	ДС, %	Статистична достовірність	ДЕ, %	СП(+)	СП(-)
ПЧ, с	18,1	92,2	$\chi^2=5,17$ $p<0,05$	63,2	2,3	0,9
П, %						
АЧТЧ, с	46,0	97,7	$\chi^2=64,69$ $p<0,001$	74,7	20,0	0,6
$I_{\text{АЧТЧ}}^{\S}$						
Фібриноген, мг/мл	3,8	94,5	$\chi^2=0,305$ $p>0,05$	59,8	0,7	1,0
Агрегація тромбоцитів з АДФ, с	30,8	81,4	$\chi^2=4,18$ $p<0,05$	58,9	1,7	0,9

Примітки:

- \S індекс (I) розраховується як співвідношення часу зсідання у дослідній плазмі до відповідного часу зсідання у контрольній плазмі;
- Пояснення скорочень подано в методах дослідження.

Дані, щодо діагностичної придатності трьохетапного комплексу тестів на виявлення ВА у хворих з підозрою на наявність АФС представлено у табл. 2. На першому етапі жоден тест не демонструє достатньої ДЧ. Одночасно достатня ДС усіх скринінгових фосфоліпід-залежних тестів свідчить про високу ймовірність наявності ВА при їх позитивному результаті. Однак, завдяки недостатньо високій ДЧ вони не дозволяють звужити коло пацієнтів, у яких запідозрений АФС. Для ЛЧ ($I_{\text{ЛЧ}}$) ДЧ та ДС становили 56,7% та 95,3% ($\chi^2=76,64$; $p<0,001$), для АЧТЧ ($I_{\text{АЧТЧ}}$) ДЧ та ДС становили 65,4% та 90,6% відповідно. При

виконані ПЧ_{1:50} (I_{ПЧ(1:50)}) та ПЧ_{1:500} (I_{ПЧ(1:500)}) ми спостерігали дещо нижчу чутливість 48,1% та 53,9% ($\chi^2=62,38$; $p<0,001$) і значну ДС – 96,0% та 93,7% відповідно ($\chi^2=65,61$; $p<0,001$). ДЕ тестів скринінгового етапу майже не знижується менше 75,0%, що вказує на достатньо високу частку правильних істино-позитивних та істино-негативних результатів серед всіх обстежених (табл. 2). Для ЛЧ цей показник становив 78,1%, АЧТЧ_(ВА-чутл.) – 79,4%, ПЧ_(1:50) – 74,7%, ПЧ_(1:500) – 76,0%.

Результати аналізу посттестової вірогідності позитивного результату скринінгового тесту у пацієнта із АФС у порівнянні із пацієнтами без АФС (СП(+)) представлено у табл.2. Нами встановлено, що при подовженому ЛЧ (I_{ЛЧ}) ймовірність наявності у пацієнтів АФС є у 12,1 рази більшою, ніж у осіб без АФС, у 7 разів більшою є ймовірність при подовженому АЧТЧ_(ВА-чутл.) (I_{АЧТЧ(ВА-чутл.)}), у 12,0 та 6,0 разів більшою при подовженому ПЧ_(1:50) (I_{ПЧ(1:50)}) та ПЧ_{1:500} (I_{ПЧ(1:500)}) відповідно. Низьку вірогідність, що пацієнт є здоровим у разі від'ємного (нормального) результату дослідження ми спостерігали на етапі скринінгу ВА. СП (-)тестів першого етапу становило: для ЛЧ – 0,5, АЧТЧ_(ВА-чутл.) – 0,4, ПЧ_(1:50) та ПЧ_(1:500) – по 0,5 (табл. 2). Отже, в зв'язку із високою ДС СП(+) фосфоліпід-залежних скринінгових тестів є достатньо високим (більше 10,0) та позитивний результат може вказувати на високу вірогідність наявності ВА. З іншого боку – недостатня ДЧ цих тестів не дає значної впевненості у відсутності антикоагулянту при нормальному часі зсідання.

На етапі виключення дефіциту фактору (корекційні тести) ми спостерігали низьку ДЧ та високу ДС усіх тестів (табл.2). Для ЩА_{ЛЧ} ці показники становили 40,8% та 99,2% відповідно ($\chi^2=86,45$; $p<0,001$), для ЩА_{АЧТЧ(ВА-чутл.)} - 33,3% та 99,2% ($\chi^2=44,74$; $p<0,001$), ЩА_{ПЧ(1:50)} - 44,6% та 98,5% ($\chi^2=58,17$; $p<0,001$) та для ЩА_{ПЧ(1:500)} – 38,7% та 97,7% відповідно ($\chi^2=45,67$; $p<0,001$). ДЕ корекційних тестів була значною та становила для ЩА_{ЛЧ} – 88,2%, ЩА_{АЧТЧ(ВА-чутл.)} – 76,3%, ЩА_{ПЧ(1:50)} та ЩА_{ПЧ(1:500)} – 82,2% та 78,5% відповідно.

Таблиця 2 – Чутливість, специфічність, діагностична ефективність та співвідношення правдивості тестів на виявлення вовчакового антикоагулянту (ВА) у пацієнтів з підозрою на антифосфоліпідним синдромом (АФС)

Тест	ДЧ, %	ДС, %	Статистична достовірність	ДЕ, %	СП(+)	СП(-)
<i>1 етап - скринінгові тести</i>						
ЛЧ,с	56,7	95,3	$\chi^2=76,64$ $p<0,001$	78,1	12,1	0,5
I ЛЧ						
АЧТЧ (ВА-чутл.), с	65,4	90,6	$\chi^2=80,33$ $p<0,001$	79,4	7,0	0,4
I _{АЧТЧ} (ВА-чутл.)						
ПЧ (1:50), с	48,1	96,0	$\chi^2=62,38$ $p<0,001$	74,7	12,0	0,5
I _{ПЧ} (1:50) §						
ПЧ (1:500), с	53,9	93,7	$\chi^2=65,61$ $p<0,001$	76,0	8,6	0,5
I _{ПЧ} (1:500) §						
<i>2 етап - корекційні тести</i>						
ЩА лч	40,8	99,2	$\chi^2=86,45$ $p<0,001$	88,2	50,0	0,6
ЩА АЧТЧ (ВА-чутл.)	33,3	99,2	$\chi^2=44,74$ $p<0,001$	76,3	41,3	0,7
ЩА ПЧ(1:50)	44,6	98,5	$\chi^2=58,17$ $p<0,001$	82,2	29,7	0,6
ЩА ПЧ(1:500)	38,7	97,7	$\chi^2=45,67$ $p<0,001$	78,5	16,8	0,6
<i>3 етап - тести на підтвердження</i>						
НС лч	61,5	98,4	$\chi^2=87,42$ $p<0,001$	87,8	38,1	0,4
НС АЧТЧ (ВА-чутл.)	77,8	95,4	$\chi^2=99,11$ $p<0,001$	89,1	16,9	0,2
НС ПЧ(1:50)	75,6	97,7	$\chi^2=106,86$ $p<0,001$	92,0	32,9	0,3
НС ПЧ(1:500)	74,4	96,9	$\chi^2=94,34$ $p<0,001$	91,7	24,0	0,3

Примітки:

- § індекс (I) розраховується як співвідношення часу зсідання у дослідній плазмі до відповідного часу зсідання у контрольній плазмі;
- Пояснення скорочень подано в методах дослідження.

Як видно з табл. 2, усі показники посттестової вірогідності СП(+) корекційних тестів є більше 10,0 СП(+): для ЩА лч становило 50,0, для тесту

ЩА АЧТЧ (ВА-чутл.) – 41,3, для ЩА ПЧ_(1:50) – 29,7 та для ЩА ПЧ_(1:500) – 16,8. СП(-) було у межах 0,6-0,7, що зберігає деяку вірогідність хвороби при негативному результаті тесту. Отже, завдяки високій ДС при ЩА, більше 15,0% можна з високою ймовірністю виявити активність ВА та діагностувати АФС. В той самий час, низька ДЧ тестів цього етапу не дає впевненості, що при рівні ЩА менше 15,0% ВА та АФС відсутні, та не дозволяє віддиференціювати дефіцит фактора з наявністю інгібіції системи зсідання.

На етапі підтвердження фосфоліпід-залежної природи інгібітора усі тести мають статистично достовірну значну діагностичну придатність та можуть бути достатньо надійними для виявлення активності ВА (табл. 2). ДЧ та ДС для тесту НС_{ЛЧ} становила 61,5% та 98,4% відповідно ($\chi^2=87,42$; $p<0,001$), для НС_{АЧТЧ (ВА-чутл.)} – 77,8% та 95,4% відповідно ($\chi^2=99,11$; $p<0,001$), для НС_{ПЧ(1:50)} – 75,6% та 97,7% відповідно ($\chi^2=106,86$; $p<0,001$) та для НС_{ПЧ(1:500)} – 74,4% та 96,9% відповідно ($\chi^2=94,34$; $p<0,001$). Також тести III-го етапу демонструють високий відсоток правильних результатів серед всіх обстежених пацієнтів з підозрою на АФС (табл.2), про що свідчать наступні показники: ДЕ НС_{ЛЧ} – 87,8%, НС_{АЧТЧ (ВА-чутл.)} – 89,1%, НС_(1:50) – 92,0%, НС_(1:500) – 91,7%. Серед всіх тестів на підтвердження найбільшою є вірогідність наявності ВА при позитивному результаті НС_{ЛЧ} – 38,1. Для НС_{АЧТЧ (ВА-чутл.)} показник СП(+) був найменшим – 16,9, для НС_{ПЧ(1:50)} та НС_{ПЧ(1:500)СП(+)} становило 32,9 та 24,0 відповідно. З помірною ймовірністю можна стверджувати про відсутність ВА за від'ємними результатами усіх тестів на підтвердження: СП(-) для НС_{ЛЧ} – 0,4, для НС_{АЧТЧ (ВА-чутл.)} – 0,2, для НС_{ПЧ(1:50)} та НС_{ПЧ(1:500)} – по 0,3.

Висновки

1. З 233 обстежених пацієнтів з тромбозами та патологією вагітності АФС було діагностовано у 44,6%. У групі хворих з АФС ВА виявлено у 95,2% випадків.
2. У зв'язку з низькою діагностичною придатністю такі рутинні тести як ПЧ (III), кількість фібриногену та агрегація тромбоцитів з агоністом АДФ не

можуть бути застосовані для виключення або підтвердження наявності ВА та слугувати ідентифікаторами захворювання. Достатньо високі ДС, ДЕ, СП(+) рутинного тесту АЧТЧ ($I_{\text{АЧТЧ}}$) дозволяють запідозрити наявність патологічного антикоагулянту та АФС.

3. Оскільки жоден коагулологічний тест з трьохетапоного алгоритму діагностики ВА не демонструє 100,0% чутливості і специфічності, ймовірність виявлення активності антикоагулянту при використанні I-го тесту не є високою, необхідно паралельно виконувати декілька тестів, що дозволить збільшити загальну інформативність діагностичного процесу.

4. Фосфоліпід-залежні тести скринінгового етапу діагностики ВА мають високу діагностичну інформативність завдяки значній ДС, ДЕ та ймовірності наявності ВА у разі їх позитивного результату. Недостатня ДЧ тестів I-го етапу не дає значної впевненості у відсутності ВА у разі нормального часу зсідання.

5. Усі показники посттестової вірогідності корекційних тестів на виявлення ВА є більше 10,0, що вказує на високу ймовірність наявності ВА при результаті ЩА більше 15,0%. Низька ДЧ цих тестів не дозволяє віддиференціювати дефіцит фактора з наявністю інгібіції системи зсідання. На етапі підтвердження фосфоліпід-залежної природи інгібітора усі тести мають значну, статистично достовірну діагностичну ефективність і є достатньо надійними для виявлення активності ВА та діагностики АФС.

Література

1. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учеб. пособие / А. А. Кишкун. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 976 с.
2. Медицинская информатика: учеб. пособие / [Чернов В.И. и др.]. - Ростов н/Д: Феникс, 2007. — 320 с.
3. Antiphospholipid syndrome: an update / Merashli M., Noureldine M. H.A., Uthman I. [et al.] // Eur. J. Clin. Investig. – 2015. - № 45. – P.653-662.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. / CLSI Document H60-A.- Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.- 94 p.- (CLSI; Vol.34, №6; April 2014).
5. Devreese K. M. J. Antiphospholipid antibody testing and standardization / K. M. J. Devreese // Int. Jnl. Lab. Hem - 2014. - №36.- P.352–363.
6. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / Miyakis S ., Lockshin M. D., Atsumi T. [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2006. - № 4.- P. 295–306.
7. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome / Keeling D., Mackie I. Moore G. W. [et al.] // Br. J. Haematol.- 2012.-№ 157.- P.47–58.
8. Kitchen S. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual. / S. Kitchen, A. McCraw, M. Echenagucia. - [2nd ed.]- Montreal, Canada: World Federation of Hemophilia (WFH).-2010.-144 p.
9. Laboratory testing for antiphospholipid syndrome / Pengo V., Banzato A., Bison E. [et al.] // Int. Jnl. Lab. Hem. - 2016.- №38 (suppl.1).- P. 27–31.
10. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection / Pengo V., Tripodi A., Reber G. [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2009.- № 7. - P. 1737–1740.

Надійшла 18.10.2017 року.

УДК 616.001.08:616.155.194.17+616-003.725

**РЕАКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНУ ЕРИТРОЦИТІВ
І КИСНЕВОТРАНСПОРТНОЇ ФУНКЦІЇ КРОВІ ПРИ ГЕМІЧНІЙ
ГІПОКСІЇ ГІПОПЛАСТИЧНОГО ГЕНЕЗУ**

І. І. Лановенко, Г. П. Гащук

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. В досліджах на щурах на моделі гемічної гіпоксії гіпопластичного генезу встановлено порушення кисневотранспортної функції (КТФ) крові (артеріальна і венозна гіпоксемія, зменшення доставки O₂, метаболічний ацидоз) і зниження вмісту (в 1,29 рази) глутатіону (GSH) і активності (в 1,57 рази) глутатіонредуктази (GR) в еритроцитах

крові. Стимуляція утворення GSH (за допомогою цистеаміну і глутаргіну) підвищує продукцію GSH, підсилює активність GR та відновлює КТФ крові; пригнічення утворення GSH (за допомогою діетилмалеату) призводить до поглиблення недостатності GSH і порушень КТФ крові. Обґрунтована можливість корекції гемічної гіпоксії за допомогою застосування донорів глутатіону.

Ключові слова: глутатіон, кисневотранспортна функція крові, апластична анемія, гемічна гіпоксія.

REACTIVITY OF GLUTATHIONE OF ERYTHROCYTES AND OXYGEN BLOOD TRANSPORT FUNCTION IN HAEMIC HYPOXIA OF HYPOPLASTIC GENESIS

I. I. Lanovenko, A. P. Gaschuk

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. *In experiments on rats with modeling haemic hypoxia of hypoplastic genesis, the damage of oxygen blood transport function (OBTF) (arterial and venous hypoxemia, delivery O₂ decrease, metabolic acidosis) and a decrease in the content (by 1,29 times) of the glutathione (GSH) and activity (by 1,57 times) of the glutathione reductase (CR) in erythrocytes of blood are determined. Activation of the generation of GSH (by means of cysteamine and glutargine) increases production GSH, it strengthens activity GR and restores OBTF; and the depression of the generation of GSH (by means of diethylmaleate) increases the GSH deficiency and OBTF damages. The possibility of a haemic hypoxia correction by means of the use of glutathione donors is grounded.*

Key words: *glutathione, oxygen blood transport function, aplastic anemia, haemic hypoxia.*

Вступ. Гіпоксія є ключовим ланцюгом багатьох форм первинної та вторинної патології; вона має пошкоджуючу дію та одночасно мобілізує всі компенсаторно-приспосувальні реакції і механізми організму. Тому адаптація організму до гіпоксії визначає його спроможність до виживання та одужання. Сучасна теорія узагальнює закономірності і механізми негайної та довготривалої адаптації теплокровного організму до гіпоксії, включаючи визначення ролі нервової та гуморальної регуляції. При гострій гіпоксії мобілізуються реакції негайної, фізіологічної, адаптації, при хронічній гіпоксії – довготривалої, біохімічної, адаптації [1, 2, 9]. Молекулярні механізми адаптації до гіпоксії реалізуються за участю фізіологічно активних речовин – кисневих сенсорів, месенджерів і активаторів: білкового фактора, індукованого гіпоксією (HIF); еритропоетину (EPO), оксиду азоту (NO) [4, 10, 12-13, 15-16].

В цьому відношенні привертає увагу глутатіон (GSH) – біологічно активна речовина, трипептид (L-гама-глутаміл-L-цистеїнілгліцин), регулятор біохімічного і фізіологічного гомеостазу людини і тварин. Глутатіон міститься майже у всіх тканинах організму і бере участь в багатьох біохімічних і фізіологічних процесах. Як активний переносник водню глутатіон регулює перебіг окисно-відновних реакцій, як донор SH-груп має велике значення в механізмах детоксикації, як антиоксидант є найважливішою ланкою антиоксидантного захисту, запобігання і обмеження оксидативного стресу [3, 7, 11, 14].

Глутатіон виконує виключну роль у підтримці структурної цілісності еритроцитів і в захисті гемоглобіну від дії різноманітних окислювачів, забезпечуючи функціонування його кисневозв'язуючих властивостей. Стан системи глутатіону в еритроцитах суттєво впливає на активність гемоглобіну і механізми регуляції киснево-транспортної функції (КТФ) крові в цілому [14-16]. Враховуючи поліфункціональні властивості глутатіону [7, 11], актуальними є дослідження його ролі в генезі гіпоксичних станів і, особливо, гемічної гіпоксії при анеміях. Гемічна гіпоксія має складний етіопатогенез [5], тому є важливим об'єктом при вивченні біологічних властивостей EPO і NO в медико-біологічних дослідженнях. Однак цілеспрямоване вивчення участі GSH в регуляції КТФ крові при анеміях ще не проводилося. Фундаментальне дослідження генезу гемічної гіпоксії з позицій оцінки функціонального стану киснево-транспортної системи (КТС), механізмів дії EPO, NO, GSH і адаптації до гіпоксії є плідотворним підходом до вирішення проблем анемії і гіпоксії.

Мета роботи – дослідити зміни і взаємодію реактивності глутатіону еритроцитів і киснево-транспортної функції крові при гемічній гіпоксії гіпопластичного генезу.

Матеріал та методи. Робота виконана в експерименті на 60 лабораторних щурах лінії Вістар масою ($242,1 \pm 9,3$) г на моделі апластичної анемії (АА) та, відповідно, - гемічної гіпоксії (ГГ) гіпопластичного генезу. АА

моделювали шляхом застосування бензольної інтоксикації (бензол - 0,2 мл/100 г маси; підшкірно, через добу, 5 разів) з наступним зовнішнім γ -опроміненням (апарат "Рокус-1": джерело опромінення - ^{60}Co , доза 5 Гр). В умовах ГГ застосовували впливи на метаболізм GSH.

Проведено чотири серії дослідів: I (n = 10) - контроль норми; II (n = 20) - контроль утворення моделі АА (ГГ); III (n = 20) - стимуляція утворення GSH в умовах ГГ шляхом введення: 1) агоніста GSH цистеаміну – ЦА (n = 10) – (10 мг/100 г маси, стандартний розчин; внутрішньоочеревинно – в/о, через добу, 5 разів); 2) донору GSH глутаргіну – Гл (n = 10) – (2 мг/100 г маси, 0,4 % фізіологічний розчин; в/о, щодобово, 5 разів); IV (n = 10) – пригнічення утворення GSH при ГГ шляхом введення антагоніста GSH (діетилмалеату – ДЕМ) – (0,05 мл/100 г маси, 20 % розчин у соняшній олії; в/о, через добу, 3 рази).

Для аналізів використовували артеріальну (а) і змішану венозну (v) кров і матеріал кісткового мозку тварин. Заключні визначення показників проводили через одну–п'ять діб після останнього застосування експериментальних впливів. Інвазивні маніпуляції виконували під анестезією.

Контролювали загальний стан тварин, гемограму (кількість еритроцитів - Ер, $\times 10^{12}/\text{л}$; лейкоцитів - Л, $\times 10^9/\text{л}$; тромбоцитів – Тр, $\times 10^9/\text{л}$ і ретикулоцитів - Рет, %; гематокритну величину – Гт, %; вміст гемоглобіну – Нб, г/л і кольоровий показник – КП, відн. од.; визначали показники обміну заліза, клітинний склад кісткового мозку – КМ (мієлограму і еритробластограму).

Для оцінки стану системи глутатіону в еритроцитах крові спектрофотометрично визначали вміст відновленого (GSH) і окисленого (GSSG) глутатіону (мкмоль/л), а також активність ключового ферменту системи GSH – глутатіонредуктази (GR, мкмоль/Г·хв) [8, 11].

Оцінка гемічної гіпоксії включала розгорнуту характеристику КТФ крові. Визначали показники: концентрацію загального гемоглобіну і його дериватів (метгемоглобіну і суми дериватів) – Нб, МтНб, ДНб, г/л; кількість еритроцитів, кольоровий показник; середній вміст гемоглобіну в еритроциті - СВГ, пг;

концентрацію в еритроцитах 2,3-дифосфогліцерату - 2,3-ДФГ, ммоль/л; концентрацію заліза в сироватці крові - СЗ, мкмоль/л; загальну і ненасичену залізо зв'язуваючу спроможність сироватки крові - ЗЗЗС, НЗЗС, мкмоль/л; насичення трансферину залізом - НТЗ, %; концентрацію феритину в сироватці крові - СФ, нг/мл; напругу кисню в артеріальній і в венозній крові - РаО₂, РvО₂, мм рт. ст.; кисневу ємкість крові - СтахО₂, об.%; вміст кисню в крові - СаО₂, СvО₂, об.%; артеріо-венозну різницю за киснем - avDO₂, об.%; хвилиний об'єм крові - ХОК, мл/(100 г·хв⁻¹); об'ємну швидкість транспорту кисню кров'ю - VaO₂, VvO₂, мл/(100 г·хв⁻¹); споживання кисню тканинами - VO₂, мл/(100 г·хв⁻¹); співвідношення швидкості транспорту кисню артеріальною кров'ю до його споживання - VaO₂/VO₂ (SCR), відн. од.; концентрацію буферних основ в крові - ВВа, ВВv, ммоль/л; зсув буферних основ - ВЕа, ВЕv, ммоль/л; концентрацію бікарбонатів - АВа, АВv, ммоль/л; актуальну реакцію крові - рНа, рНv.

Застосовували стандартні методи вимірювань. Показники газового складу, КОС крові, транспорту і утилізації кисню визначали за допомогою автоматизованої установки і біологічного аналізатору "Radelkis" (Угорщина) [9]. Результати оброблені статистичними методами, включаючи кореляційний і регресійний аналізи, за допомогою комп'ютерних прикладних програм.

Результати та їх обговорення. Отримані результати представлені в табл. 1 і 2. У інтактних тварин значення контрольних показників норми гемограми, обміну заліза, КТФ крові, мієлограми і глутатіону еритроцитів відповідали фізіологічним величинам для щурів [8-9, 11].

Після застосування впливів, спрямованих на пригнічення кістковомозкового кровотворення, у тварин відтворювалася модель АА середнього ступеня тяжкості – зменшення Ер і Нв в крові в 1,5 рази в порівнянні з нормою, помірна лейкопенія і тромбоцитопенія, наявність гіпоплазії кровотворення. На цьому фоні тваринам застосовували впливи на стан GSH з визначенням досліджуваних показників. Контролем слугували тварини з відтвореною АА, які перебували в умовах спонтанного відновлення.

При проведенні заключних вимірювань у контрольних (АА → ГГ) тварин визначалося незначне відновлення еритрону; модель зберігала працездатність. Так, кількість Ер залишалася зниженою на 37,23% відносно контролю норми, вміст Нб – на 31,50%, показник Гт – на 22,77% ($P < 0,001$). В еритроцитах майже в два рази збільшувався вміст дериватів Нб і в 1,13 рази - 2,3-ДФГ. Визначено порушення метаболізму заліза: збільшення СЗ та зменшення СФ. В КМ виявлено подразнення міелоїдного і мегакаріоцитарного паростків кровотворення, наступного їх звуження і гіпоплазії - на тлі зменшення загальної кількості еритроїдних елементів і лейко-еритроїдного співвідношення (до 9 : 1).

Створена модель АА характеризувалася значними порушеннями газового складу і КОС крові, транспорту і утилізації O_2 . Встановлено зменшення кисневих показників: PaO_2 - на 16,52%, PvO_2 - на 16,03%, $СmaxO_2$ - на 31,50%, CaO_2 - на 30,92%, CvO_2 - на 44,50% – відносно норми ($P < 0,05$). ХОК мав тенденцію до збільшення та відбувалося зменшення швидкості транспорту кисню: VaO_2 – на 28,99% ($P > 0,05$) і VvO_2 – на 42,45% ($P < 0,05$). Визначено збільшення $avDO_2$ на 8,76% та VO_2 на 12,79%. Внаслідок порушень кисневого гомеостазу розвивалася недостатність енергетичного метаболізму, про що свідчать декомпенсовані зсуви КОС крові зі зниженням pHv до $(7,297 \pm 0,024)$ та зменшенням показника SCR в 1,54 рази ($P < 0,001$). Виявлені зміни свідчать про напружений режим функціонування КТФ крові і недостатність КТС [5, 9].

Таблиця 1 – Показники гемограми, обміну заліза і глутатіону при експериментальних впливах в умовах моделі гемічної гіпоксії гіпопластичного генезу ($M \pm m$)

Показник	Контроль норми (I)	Експериментальні впливи (серія дослідів)		
		ГГ (II)	ЦА (III)	ДЕМ (IV)
Ер, $\times 10^{12}/л$	$6,50 \pm 0,26$	$4,08 \pm 0,28$ *	$4,61 \pm 0,43$ *	$4,03 \pm 0,38$ *
Нб, г/л	$144,0 \pm 3,98$	$98,6 \pm 4,94$ *	$107,9 \pm 6,31$ *	$86,47 \pm 6,19$ *
КП,	$0,67 \pm 0,025$	$0,74 \pm 0,046$	$0,72 \pm 0,033$	$0,66 \pm ,029$

Відн. од.				
СВГ, пг	22,4 ± 0,85	24,8 ± 1,53	24,1 ± 1,09	22,0 ± 0,96
Л, ×10 ⁹ /л	7,44 ± 0,80	5,61 ± 0,55	6,15 ± 1,10	5,27 ± 0,83 *
Тр, ×10 ⁹ /л	482,2 ± 50,7	362,1 ± 28,3 *	380,6 ± 51,5	317,2 ± 53,6 #
ГТ, %	42,6 ± 1,60	32,9 ± 1,08 *	34,2 ± 1,86 *	27,2 ± 1,87 * #
СЗ, мкмоль/л	14,75 ± 0,59	20,70 ± 1,38 *	16,21 ± 1,07 #	28,05 ± 1,63 *
ЗЗС, мкмоль/л	59,41 ± 1,55	72,44 ± 3,79 *	62,30 ± 3,27 * #	78,10 ± 3,92 *
НЗС, мкмоль/л	44,66 ± 1,37	51,73 ± 3,54 *	46,07 ± 2,58 * #	49,93 ± 2,47 *
НТЗ, %	24,83 ± 1,63	28,57 ± 2,49	25,99 ± 1,70	35,82 ± 2,19 * #
СФ, нг/мл	3,28 ± 0,32	2,04 ± 0,35 *	2,95 ± 0,39	1,88 ± 0,25 *
GSH ер., мкмоль/л	3,951 ± 0,662	3,073 ± 0,443	3,837 ± 0,418	1,427 ± 0,353 * #
GSSG ер., мкмоль/л	2,683 ± 0,331	2,927 ± 0,297	2,749 ± 0,406	3,805 ± 0,527 * #
GR ер., кмоль/Г·хв	5,148 ± 0,926	3,286 ± 0,229 *	3,861 ± 0,436	1,591 ± 0,406 * #

Примітки: * – P < 0,05 відносно контролю норми (серія I);

– P < 0,05 відносно контролю ГТ (серія II).

В патофізіологічному визначенні сукупність порушень КТС в умовах створеної моделі АА відповідає гемічній гіпоксії (ГТ), а в разі розвитку метаболічних ускладнень і енергодефіциту – гіпоксії змішаного типу [5, 9].

Для встановлення ролі глутатиону в генезі ГТ визначали реактивність системи GSH еритроцитів при утворенні гіпоплазії кровотворення. Встановлено зменшення вмісту відновленого глутатиону (GSH) в еритроцитах в 1,29 рази, збільшення окисленого глутатиону (GSSG) в 1,09 рази і зменшення активності глутатіонредуктази (GR) в 1,57 рази (P < 0,05). Результати свідчать, що ГТ гіпопластичного генезу в першій стадії (компенсації) призводить до незначного зменшення продукції і активності та розвитку недостатності легкого ступеня

тяжкості системи глутатіону еритроцитів. Але ураження периферичного еритрону при гемічній гіпоксії залізодефіцитного генезу призводить до формування вкрай важкої недостатності системи GSH еритроцитів [6]. Ці результати мають важливе фундаментальне значення, оскільки є дані, що гостра гіпоксична гіпоксія підвищує реактивність системи глутатіону [1, 2, 11].

При вивченні впливу на метаболізм GSH в умовах ГГ ми застосовували незначні дози біохімічних агоністів і антагоністів GSH, маючи на увазі мобілізацію механізмів фізіологічної регуляції.

Після впливу на утворення GSH за допомогою ЦА вміст GSH в еритроцитах збільшувався на 24,86% відносно значень при ГГ, вміст GSSG на 6,08% зменшувався, активність GR – на 17,50% підвищувалася. Показники GSH і GSSG відповідали нормі, а показник GR був менше норми на 25,00%.

Виявлені сполучені позитивні ефекти на еритрон: кількість Ер збільшувалась на 12,99%, показники Нв і СтахО₂ – на 9,39% відносно контролю ГГ. Менш сприятливими були власне реакції КТФ крові: збільшення РаО₂ на 9,17%, СаО₂ – на 9,96%, СvО₂ – на 17,73%, VaО₂ – на 5,02%, VvО₂ – на 9,94%, SCR – на 7,28%; зменшення ХОК – на 2,58%,; зниження VO₂ - на 2,75%. Однак, на рівні тканинного метаболізму суттєвих змін не відбувалося і зберігалися порушення КОС крові у вигляді метаболічного ацидозу.

Таблиця 2 – Показники КТФ крові при експериментальних впливах в умовах моделі гемічної гіпоксії гіпопластичного генезу (M ± m)

Показник	Контроль норми (I)	Експериментальні впливи (серія дослідів)		
		ГГ (II)	ЦА (III)	ДМ (IV)
Нв, г/л	144,0 ± 3,98	98,60 ± 4,94 *	107,9 ± 6,31 *	86,47 ± 6,19 *
MtНв, г/л	1,34 ± 0,15	2,48 ± 0,31 *	1,61 ± 0,29 *	3,15 ± 0,24 * #
2,3-ДФГ, ммоль/л	4,49 ± 0,24	5,08 ± 0,37	3,95 ± 0,23 #	6,21 ± 0,40 * #
РаО ₂ , мм рт. ст.	96,11 ± 2,38	80,23 ± 3,54 *	87,59 ± 3,71 *	74,38 ± 3,58 *

PvO ₂ , мм рт. ст.	43,99 ± 1,52	36,94 ± 3,03 *	38,15 ± 2,35 *	37,35 ± 2,01 *
StaxO ₂ , об. %	19,583 ± 0,712	13,415 ± 0,672 *	14,674 ± 0,858 *	11,759 ± 0,842 *
CaO ₂ , об. %	18,85 ± 0,477	13,02 ± 0,643 *	14,32 ± 0,810 *	11,62 ± 0,787 *
CvO ₂ , об. %	14,04 ± 0,591	7,79 ± 0,836 *	9,18 ± 0,977 *	6,70 ± 0,981 *
avDO ₂ , об. %	4,80 ± 0,191	5,22 ± 0,281	5,14 ± 0,201	4,93 ± 0,249
ХОК, мл/(100 г·хв ⁻¹)	37,067 ± 3,812	38,137 ± 1,902	37,154 ± 3,032	28,935 ± 3,586 #
VaO ₂ , мл/(100 г·хв ⁻¹)	7,120 ± 0,947	5,056 ± 0,501 *	5,310 ± 0,617 *	3,509 ± 0,625 * #
VvO ₂ , мл/(100 г·хв ⁻¹)	5,384 ± 0,823	3,098 ± 0,485 *	3,406 ± 0,495 *	2,138 ± 0,529 *
VO ₂ , мл/(100 г·хв ⁻¹)	1,736 ± 0,133	1,958 ± 0,083	1,904 ± 0,110	1,371 ± 0,118 * #
SCR, відн. од.	3,994 ± 0,223	2,597 ± 0,246 *	2,787 ± 0,254 *	2,465 ± 0,270 *
pHa	7,388 ± 0,009	7,319 ± 0,024 *	7,340 ± 0,023 *	7,234 ± 0,030 * #
pHv	7,357 ± 0,008	7,297 ± 0,024 *	7,316 ± 0,022 *	7,195 ± 0,029 * #

Примітки: * – P < 0,05 відносно контролю норми (серія I);

– P < 0,05 відносно контролю ГГ (серія II).

Застосування стимуляції утворення GSH за допомогою препарату глутаргін проявлялося якісно однотипними, але кількісно потужнішими адаптаційними реакціями досліджуваних функцій і показників, ніж при дії цистеаміну. Зокрема, було виявлено більш значне збільшення ключових показників: Hb - на 16,03% і GSH - на 15,73%. З огляду на замісні властивості екзогенного глутатіону, можна стверджувати, що при гіпоксії більш важкого ступеня він є більш ефективним засобом відновлення метаболізму і функцій ендogenous глутатіону, ніж стимулятори. Відповідно, отримані результати, а саме – реакції відновлення КТФ крові, демонструють можливість корекції гемічної гіпоксії за допомогою засобів, що є донорами глутатіону.

Після впливу на метаболізм GSH за допомогою його антагоністу ДЕМ виявлена негативна реакція еритропоезу і КТФ крові, зокрема, артеріальної і

венозної гіпоксемії, утворення дериватів гемоглобіну, транспорту і утилізації кисню. Так, показник Hb зменшувався на 12,34%, показник CaO₂ – на 10,70%, показник avDO₂ – на 5,72%; показник ХОК - на 24,13%; показник VaO₂ – на 30,60%, VO₂ – на 29,98% - відносно контролю ГГ. Значне зменшення споживання кисню та розвиток декомпенсованого ацидозу змішаного типу свідчать про розвиток важкої загальної патології та декомпенсації КТС [5].

Відносно сильнішими були прямі негативні ефекти ДЕМ на систему глутатіону еритроцитів. Так, показник GSH зменшувався відносно контролю ГГ в 2,15 рази, показник GR зменшувався в 2,07 рази, а показник GSSG в 1,30 рази збільшувався. Слід зазначити, що всі показники GSH достовірно відрізнялись від значень норми. Така реактивність свідчить про глибоке ураження системи глутатіону при ГГ та формування оксидативного стресу [7].

Закономірності функціональних взаємозв'язків і взаємодії систем GSH і КТФ крові при гемічній гіпоксії гіпопластичного генезу підтверджені за допомогою кореляційного і регресійного аналізів. Виявлено існування сильних прямих кореляційних зв'язків між показниками GSH і КТФ крові (Hb, VaO₂, VO₂), а також метаболізму заліза.

Таким чином, встановлено, що гіпоплазія кровотворення призводить до розвитку апластичної анемії, гемічної гіпоксії та недостатності системи глутатіону еритроцитів. Визначені ефекти регуляції метаболізму GSH в умовах гемічної гіпоксії за допомогою активації (цистеамін, глутаргін) і пригнічення (діетилмалеат) його утворення на КТФ крові, включаючи кисневозв'язуючі властивості гемоглобіну і кістковомозкове кровотворення. Встановлено, що стимуляція утворення GSH сприяє відновленню GSH, КТФ і кисневого режиму крові; пригнічення утворення GSH надає негативний вплив на всі системи. Застосування донора глутатіону надає найсприятливіший ефект щодо нормалізації GSH еритроцитів, а також викликає значне обмеження порушень КТФ крові – відносно усунення гемічної гіпоксії.

Результати досліджень свідчать, що в умовах гемічної гіпоксії можлива цілеспрямована регуляція метаболізму глутатіону за допомогою стимуляції або пригнічення його утворення. Однак принципово важливим є факт відносно можливості регуляції також КТФ крові шляхом впливу на систему GSH, тим самим позначаючи їхній функціональний взаємозв'язок. Загальна закономірність взаємодії GSH еритроцитів і КТФ крові при гемічній гіпоксії гіпопластичного генезу полягає в наступному: після пригнічення утворення GSH відбувається прогресування порушень і формування недостатності КТФ крові; індуковане стимуляцією утворення підвищення активності GSH приводить до відновлення КТФ і оптимізації кисневого режиму крові.

Висновки

1. В експерименті на щурах на моделі гемічної гіпоксії гіпопластичного генезу встановлено типові порушення кисневотранспортної функції (КТФ) крові і розвиток недостатності системи глутатіону (GSH) еритроцитів.

2. Обгрунтовано новий напрям регуляції КТФ крові при гемічній гіпоксії – за допомогою цілеспрямованого впливу на метаболізм GSH (застосування агоністів та антагоністів), а також можливість корекції гемічної гіпоксії – за допомогою застосування препаратів або засобів, що є донорами глутатіону.

Література

1. Внесок школи М. М. Сиротиніна в дослідження конструктивних та деструктивних механізмів розвитку гіпоксичних станів організму / П. В. Білошицький, І. І. Лановенко, Ю. М. Онопчук, О. М. Ключко // Тр. Крымского гос. мед. универ-та им. С. И. Георгиевского. – 2006. – Т. 142, ч. 3. – С. 23–26.

2. Гіпоксія: деструктивна та конструктивна дія : матеріали Міжнародної конференції та Приельбруських бесід (Київ, 10-12 червня; Терскол, 6-12 серпня 1998). – К., 1998. – 238 с.

3. Кулинский В. И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи совр. биологии. – 1990. – Т. 110, № 1. – С. 20-33.

4. Лановенко І. І. Оксид азоту – універсальний регулятор клітинних

функцій / І.І. Лановенко // Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. – 2008. – Вип. 34, Т. I. – С. 227-234.

5. Лановенко И. И. Кислородный гомеостаз и генез гипоксии при анемиях / И.И. Лановенко // Вестник гематологии. – 2012. – Том VIII, № 4. – С. 42-43.

6. Лановенко И. И., Гащук А. П. Взаимодействие глутатиона эритроцитов и кислородтранспортной функции крови при гемической гипоксии железодефицитного генеза // Доклады НАНУ. – 2012. – № 12. – С. 178-185.

7. Лановенко І. І. Глутатіон і оксидативний стрес / І. І. Лановенко, А. С. Тимченко, Т. М. Цугорка // Гематологія і переливання крові : міжвідомчий збірник. - 2012. – Вип. 36. – С. 138-148.

8. Мальцев Г. Ю. Методы определения содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / Г.Ю. Мальцев, Н.В. Тышко // Гигиена и санитария. - 2002. – № 2. – С. 69-72.

9. Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии / М .М. Середенко, В .П. Дударев, И. И. Лановенко [и др.] – К.: Наук. думка, 1987. – 200 с.

10. Fisher J.W. Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update / James W. Fisher // Exp. Biol. and Med. – 2003. – Vol. 228, No 1. – P. 1-14.

11. Forman H.J. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / Henry Jay Forman, Hongqiao Zhang, and Alessandra Rinna // Mol. Aspects Med. – 2009. – Vol. 30, No 1-2. – P. 1–12.

12. Kumar P. Sensing hypoxia in the carotid body: from stimulus to response / P. Kumar // Essays in biochemistry. – 2007. – Vol. 43. – P. 43-60.

13. Moncada S. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs // Pharmacol. Rev. – 1991. – Vol. 43, No 2. – P. 109-142.

14. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation / Pallard´o F.V., Markovic J., Garc´ia J.L., and Vina J. // Mol. Aspects Med. – 2009. – Vol. 30. – P. 77-85.

15. Semenza G.L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 / G.L. Semenza // Physiology. – 2009. – Vol. 24, No 2. – P. 97-106.

16. Stockmann C. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression / Stockmann C., Fandrey J. // Clinical and experimental physiology and pharmacology. – 2006. – 33 (10). – P. 968-979.

Надійшла 18.09.2017 року.

УДК 645.38

ВИРОБНИЦТВО ПРЕПАРАТІВ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ В УКРАЇНІ ТА КОНТРОЛЬ ЇХНЬОЇ ЯКОСТІ

В. В. Любич

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

***Резюме.** У роботі актуалізується проблема виробництва препаратів донорської крові в закладах служби крові України та контролю їхньої якості.*

***Ключові слова:** препарати донорської крові, контроль якості, аналітично-нормативна документація, Належна виробнича практика, Належна лабораторна практика.*

THE PRODUCTION OF DONOR BLOOD PREPARATIONS IN UKRAINE AND ITS QUALITY CONTROL

V.V.Lyubych

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

***Summary.** In the article we concentrate attention on the problem of the production donor blood preparations in Ukraine and on the problem of quality control of donor blood preparations.*

***Key words:** donor blood preparations, quality control, analytical and normative documents, Good Manufacturing Practices, Good Laboratory Practices*

Вступ. Важлива роль національної системи охорони здоров'я у вирішенні проблем безпеки компонентів та препаратів донорської крові полягає у створенні умов для належного контролю їхньої якості. В Україні з метою забезпечення контролю за якістю гемотрансфузійних середовищ у структуру станцій переливання крові (СПК) були введені відділи контролю якості (ВКЯ), а при науково – дослідних інститутах створені лабораторії державного

контролю: Центральна лабораторія державного контролю за якістю компонентів та препаратів донорської крові (ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», м.Київ) і Зональна лабораторія державного контролю за якістю компонентів та препаратів донорської крові (ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», м.Львів) [6].

Основними обов'язками лабораторій державного контролю є організація і проведення державного контролю якості компонентів та препаратів донорської крові, що виготовляють заклади служби крові (ЗСК). У зв'язку з цим лабораторії державного контролю проводять консультативний, попередній, подальший (відбірковий) та арбітражний контроль.

Мета. Аналіз стану виробництва препаратів донорської крові в закладах служби крові України та роботи Центральної лабораторії державного контролю за якістю компонентів та препаратів донорської крові за період від 2014 р. по 2016 р.

Матеріали і методи. Державний контроль якості препаратів донорської крові, що виробляли заклади служби крові України, здійснювався згідно з графіком щоквартальних «План-завдань», затверджених директором інституту.

За період 2014-2016 рр. до Центральної лабораторії державного контролю за якістю компонентів та препаратів донорської крові на подальший контроль надійшло 89 серій препаратів донорської крові такої номенклатури: розчин альбуміну 5% і 10%, імуноглобуліни спрямованої дії, полібіолін, інфузамін. Контроль якості препаратів проводився відповідно до Настанов з якості медичних імунобіологічних препаратів, затверджених Наказами МОЗ України [7-13]; аналітично - нормативної документації (АНД) виробника, Державної Фармакопеї України [1- 4] та з використанням методик, що регламентовані нормативними документами. У лабораторії розроблено стандартні операційні процедури на кожний препарат, що контролювався, використовувались державні та галузеві стандарти. Дослідження препаратів проводили у таких напрямках: визначення фізико-хімічних властивостей; біологічні випробування

на стерильність і специфічну активність; на відсутність пірогенності і токсичності та на інфекційну безпечність.

Результати та їх обговорення. Слід зазначити, що кількість надісланих на держконтроль препаратів донорської крові за останні роки значно зменшилась, а також зменшився спектр препаратів, що надходили на держконтроль. Це пов'язано з тим, що планові завдання станції переливання крові та Центри крові виконують не в повному обсязі. Основні причини: значне скорочення донорства; зношеність виробничого устаткування; відсутність новітнього лабораторного обладнання; загострення проблеми інфекційної безпеки; незадовільне фінансування; відсутність ліцензії GMP (для реєстрації та перереєстрації препаратів), що призвело до зменшення кількості плазми, що переробляється на компоненти і виготовлення препаратів. Усе це спричинило зниження виробничих показників у закладах служби крові та, відповідно, зменшення надходжень препаратів на подальший державний контроль (Табл. 1).

Таблиця 1 – Виробництво препаратів донорської крові в ЗСК України (за даними звітів з первинного контролю якості, 2001-2016 рр.)

Рік	Виготовлено серій препаратів	Не відповідали аналітично-нормативній документації
2001	3714	6
2002	3190	3
2003	3008	1
2004	2434	9
2005	1837	8
2006	1511	10
2007	1267	4
2008	978	3
2009	1038	-
2010	778	-
2011	730	2

2012	630	1
2013	602	1
2014	367	1
2015	269	-
2016	298	2

Відповідно до статті 9 Закону України «Про лікарські засоби» препарати донорської крові допускаються до медичного застосування та реалізації після державної реєстрації. Заклади служби крові, що виготовляють препарати, мають сертифікати державної реєстрації (перереєстрації), однак термін їх дії закінчується в 2017 р.. Однією з умов перереєстрації препаратів є виконання вимог GMP/GLP (Good Manufacturing Practices – Належної виробничої практики, Good Laboratory Practices – Належної лабораторної практики) під час виготовлення та контролю якості препаратів [5]. Наразі ЦК(ОСПК), СПК України ліцензії GMP/GLP не мають, тому до кінця 2017 р. виробництво препаратів у ЗСК України буде призупинено і вироблятися будуть лише компоненти донорської крові (табл. 2, 3).

Таблиця 2 – Заклади служби крові, що виготовляли препарати донорської крові у 2014 – 2016 рр. і надсилали на державний контроль до ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»

№ з/п	Заклади служби крові	2014 р.	2015 р.	2016 р.
1	Кримська РУ «ЦСК»	+	-	-
2	КЗ «Днепропетровська ОСПК»	+	+	+
3	КЗОЗ «Донецька ОСПК»	+	-	-
4	СПК м. Горлівка	+	-	-
5	Київська ОСПК (Б. Ц.)	-	-	-
6	Кіровоградська ОСПК	-	-	-
7	КУ «Запорізька ОСПК»	+	+	+

8	КЗ «Криворізька СПК ДОР»	+	+	+
9	Луганська ОСПК	+	-	-
10	ЗКВ «Миколаївська ОСПК»	+	+	+
11	Сумський ОЦСК	-	-	-
12	КЗОЗ «Харківський ОЦСК»	+	+	+
13	КУ «Херсонський ОЦСК»	+	+	+
14	КЗ «Чернігівська ОСПК»	+	+	+
15	Черкаська ОСПК	-	-	-
16	КУ «Центр крові» м. Севастополь	+	-	-
17	Київський МЦК	-	-	-
Усього ЗСК		12	7	7

Таблиця 3 – Заклади служби крові, що виготовляли препарати донорської крові у 2014 – 2016 рр. і надсилали на державний контроль до ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»

№ з/п	Заклади служби крові	2014 р.	2015 р.	2016 р.
1	ОКУ «Вінницька ОСПК»	+	+	+
2	Волинська ОСПК	+	+	+
3	Володимир-Волинська МСПК	+	+	+
4	Житомирський ОЦСК Новоград-Волинська філія ЖОЦСК	+	+	-
5	Закарпатська ОСПК	+	+	+
6	Івано-Франківська ОСПК	+	+	+
7	Львівський ОЦСК Сокальська філія ЛОЦСК	-	-	+
8	КУ «Одеська ОСПК»	+	+	-
9	Рівненська ОСПК	+	+	+

10	КУТОР «Тернопільський ОЦСК	+	+	+
11	Теребовлянська ОСПК	+	+	+
12	КЗОЗ «Хмельницька ОСПК»	+	+	+
13	Чернівецький ОЦСК Хотинська СПК	-	-	-
Усього ЗСК		11	11	10

Результати подальшого державного контролю якості препаратів донорської крові, надісланих у Центральну лабораторію державного контролю із ЗСК України у 2014 – 2017 рр., представлено у таблиці 4.

Як видно з наведених у таблиці даних, за вказаний період у Центральній лабораторії державного контролю проконтрольовано 89 серій препаратів донорської крові, при цьому проведено 19895 аналізів (з урахуванням повторних досліджень). Усі препарати відповідали вимогам АНД.

Таблиця 4 – Державний контроль якості препаратів донорської крові у Центральній лабораторії державного контролю за якістю компонентів та препаратів донорської крові за період 2014 – 2016 рр

Рік	ЗСК України, що виготовляли препарати	Проконтро льовано серій препаратів	Виконано аналізів	Результати контролю	
				АНД	
				Відповідали	Не відповідали
2014	12	34	4462	34	-
2015	7	29	8780	29	-
2016	7	26	6653	26	-
Усього	26	89	19895	89	-

Згідно з наказом МОЗ України № 252 Центральна лабораторія державного контролю за якістю компонентів та препаратів донорської крові

проводить аналіз річних звітів ЗСК із первинного контролю якості препаратів крові, що подають відділи контролю якості ЗСК щорічно у лабораторію .

Результати первинного контролю якості препаратів донорської крові, надісланих у Центральну лабораторію державного контролю із ЗСК України, передаються для публікації у збірнику «Діяльність закладів служби крові України». Аналіз результатів первинного контролю якості препаратів донорської крові за даними річних звітів ВКЯ показав, що за період 2014 – 2016 рр. не відповідали вимогам АНД три серії препаратів.

Висновки

1. Підтверджено важливу роль служби державного контролю під час серійного виробництва препаратів донорської крові в ЗСК України.

2. Зовнішня оцінка якості гемотрансфузійних середовищ необхідна для об'єктивної оцінки стану виробництва у ЗСК України і, відповідно, запобігання випуску неякісної продукції.

Література

1. Державна Фармакопея України. Перше видання. – Харків: Міністерство охорони здоров'я України, 2001. – 531 с.

2. Державна Фармакопея України. Перше видання. Доповнення 1. – Харків: Міністерство охорони здоров'я України, 2004. – 494 с.

3. Державна Фармакопея України. Перше видання. Доповнення 4. – Харків: Міністерство охорони здоров'я України, 2011. – 538 с.

4. Державна Фармакопея України. Друге видання. 2 том. – Харків: Міністерство охорони здоров'я України, 2014. – 722 с.

5. Лекарственные средства. Надлежащая производственная практика. Руководство 42-01-2001. – К. : Министерство здравоохранения Украины, 2003. – С.14-18.

6. Наказ МОЗ України від 23 12. 1993 року № 252 «Про заходи посилення державного контролю за якістю препаратів крові, кровозамінників та

консервуючих розчинів, що виготовляються установами служби крові України». – К. : Міністерство охорони здоров'я, 1993. – 30 с.

7. Наказ МОЗ України від 02.06.2005 р. № 247: Настанова з якості 42-3002-001-2005; – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2005. – 10 с.

8. Наказ МОЗ України від 02.06.2005 р. № 247: Настанова з якості 42-3002-002-2005; – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2005. – 22 с.

9. Наказ МОЗ України від 02.06.2005 р. № 247: Настанова з якості 42-3002-003-2005; – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2005. – 27 с.

10. Наказ МОЗ України від 02.06.2005 р. № 247: Настанова з якості 42-3002-004-2005; – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2005. – 8 с.

11. Наказ МОЗ України від 02.06.2005 р. № 247: Настанова з якості 42-3002-005-2005; – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2005. – 9 с.

12. Наказ МОЗ України від 26.07.2005 р. № 375: Настанова з якості 42-3002-009-2005; – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2005. – 14 с.

13. Наказ МОЗ України від 26.07.2005 р. № 376: Настанова з якості 42-3002-011-2005; – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2005. – 191 с.

Надійшла 10.11.2017 року.

УДК 615.38

ВИЯВЛЕННЯ КРИТИЧНИХ ЛАНОК В ЗАБЕЗПЕЧЕННІ ЯКОСТІ КОМПОНЕНТІВ КРОВІ ПРИ ПІДГОТОВЦІ ЇХ ДО ГЕМОТРАНСФУЗІЙ

В. В. Любчак², А. С. Тимченко¹, І. В. Анциферова²

¹ ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України", Київ

² ДУ «Сумський державний університет», Суми

***Резюме.** В роботі представлені результати аудиту лікарень м. Суми, які займаються переливанням крові та її компонентів. У 16 відділеннях проводили розморожування та підігрів компонентів крові і визначали які пристрої використовувались в операційних.*

***Ключові слова:** плазма крові, фактори згортання, пристрій, розморожування.*

**DETERMINATION OF CRITICAL LAMINATES AFTER USE OF
BLOOD QUALITY OF COMPONENTS IN PREPARATION OF
HEMOTRANSFUSION**

V.V. Lyubchak², A. S. Timchenko¹, I.V. Antsiferova²

¹ SI "Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine", Kyiv

² SI «Sumy State University», Sumy

Summary. The paper presents the results of an audit of the Sumy hospitals that deal with blood transfusion of its components. In 16 compartments, defrosting and heating of blood components were performed and determined which devices were used in operating systems.

Key words: blood plasma, coagulation factors, device, defrosting.

Вступ. Заходи з підвищення безпеки гемотрансфузійної терапії регламентовані низкою наказів та вказівок Міністерства охорони здоров'я України. Однак їхня реалізація відбувається повільно і вітчизняне виробництво препаратів плазми крові не відповідає потребам охорони здоров'я ні за номенклатурою, ні за об'ємом, ні за якістю продукції, що випускається, а також весь час скорочується кількість центрів крові, що виробляють білкові препарати плазми крові.

Зниження безпеки та ефективності всіх етапів гемотрансфузійного «ланцюжка» – від заготівлі крові та її компонентів до їхнього клінічного застосування відбувається при вкрай незадовільній матеріально-технічній базі закладів служби крові в Україні.

Слід зазначити, що діяльність гемотрансфузіологів пов'язана зі збереженням життя громадян України, особливо при наданні високотехнологічної допомоги при загрозливих для життя невідкладних станах і, перш за все при політравмах та масивних крововтратах різного походження.

В даний час у високоспеціалізованих клініках широко використовується переливання крові та її компонентів. Зокрема, одним з найбільш вживаних компонентів крові на сьогоднішній день є свіжозаморожена плазма, яка

використовується для заміщення дефіциту факторів згортання крові та відновлення об'єму циркулюючої крові [1].

Свіжозаморожена плазма крові містить нормальні рівні стабільних факторів згортання крові, альбуміну та імуноглобулінів. В нормі, рівень фактора VII на 100 мл становить ≥ 70 МО і приблизно аналогічні кількості інших лабільних факторів згортання та природних інгібіторів. Плазму необхідно зберігати при температурі $-25-30^{\circ}$ С і нижче. Після розморожування плазма повинна бути використана для трансфузії не пізніше 6 годин. Особливу увагу слід звертати на те, що найважливіші білкові компоненти плазми є термолабільними [2]. Найбільш лабільним фактором згортання крові є фактор VIII, в меншій мірі – фібриноген та фактор X. Вони змінюють свою структуру при неналежному розморожуванні та підігріві. При цьому, вміст факторів згортання крові не зменшується за фізіологічні межі, але відбувається зниження їх активності [3]. Це веде до зниження ефективності компонентів крові та, відповідно, до збільшення кількості необхідних вливань з метою досягнення очікуваного терапевтичного ефекту.

Згідно сучасних стандартів менеджменту та якості (GMP та GCP), якісна трансфузія можлива лише в разі забезпечення належного контролю на всіх етапах від донації до гемотрансфузії. Так, за вимогами Ради Європи, свіжозаморожена плазма, з метою збереження лабільних факторів, повинна бути використана в найближчий час після розморожування. Розморожена плазма не підлягає повторному заморожуванню і повинна містити після розморожування не менше 0,7 МО/мл фактора VIII [4].

Після імплементації угоди з ЄС, українські центри переливання крові почали переходити на європейські стандарти GMP. Згідно плану адаптації законодавства України до законодавства Європейського Союзу, затвердженого розпорядженням Кабінету Міністрів України від 09.06.2010 N1196-р, з метою запобігання поширенню інфекційних хвороб через застосування крові, її компонентів і препаратів у медичних цілях,

виникненню пов'язаних з цим інших негативних наслідків для здоров'я реципієнтів, було видано Наказ №1112 від 14.12.2010 «Про затвердження Положення для установ переливання крові (щодо організації управління системою якості і безпеки донорської крові та її компонентів).

Стандарт GMP, як і будь-який інший стандарт менеджменту якості, базується на процесному підході та валідації процесів. Відповідно, не можна відокремити частину процесу та проводити валідацію. Відомо, що в Україні забір крові регламентується Законом України «Про донорство крові та її компонентів», дослідження додатково описані в Наказі №385 МОЗ України від 16.08.2005 «Про інфекційну безпеку донорської крові та її компонентів», а належне розморожування та підігрів компонентів крові при трансфузії взагалі не регламентовані в жодному нормативному документі України [5, 6]. Тому, наразі, цей етап на шляху крові та її компонентів від донора до реципієнта є одним з найкритичніших.

Матеріали і методи. Для визначення обсягу проблеми, нами було проведено *аудит* лікарень міста Суми, що займаються переливанням крові та її компонентів, методом кореспондентського опитування.

До даного дослідження включені дані по наступним лікувальним закладам: Сумська обласна клінічна лікарня (СОКЛ), Сумська міська клінічна лікарня №5, Сумська центральна міська лікарня №1. Дослідження проводилось на базі відділень, де протягом 2015-2016 років проводилось переливання крові та її компонентів. Загалом, в дослідженні було використано досвід розморожування та підігріву 16 відділень. Серед них, 7 відділень Сумської обласної клінічної лікарні, 4 відділення Сумської центральної міської лікарні №1 та 5 відділень Сумської міської клінічної лікарні №5.

Статистична обробка даних проводилась за допомогою програми «STATISTICA 10 Enterprise».

Результати дослідження. В результаті проведених досліджень, було отримано наступні дані. Спеціальний розморожувач, зі слів персоналу, є лише в

одному відділенні. Тип пристрою ТУ 64-1-2850-80. Нами була проведена ідентифікація пристрою за його моделлю та номенклатурою медичної апаратури. Згідно отриманих даних, зазначений пристрій є лабораторною водяною банею з електропідігрівом 1980 року випуску, а отже, не є спеціалізованим розморожувачем плазми крові. В усіх інших випадках використовувались наступні методи розморожування: розморожування при кімнатній температурі на повітрі проводиться в 5 відділеннях; розморожування та підігрів компонентів крові на водяній бані здійснюють в 5 відділеннях; в теплій воді ($t = 36,6-37,0^{\circ}\text{C}$) розморожування та підігрів проводять в 6 відділеннях. Окрім того, в разі необхідності швидкого розморожування та підігріву, у двох вищезазначених відділеннях переходять на розігрів у теплій воді, а інколи на батареях водяного опалення.

Серед отриманих результатів спостерігається наступний відсотковий розподіл методів розморожування та підігріву плазми крові серед лікарень: у Сумській обласній клінічній лікарні у 71,4% випадків користуються розморожуванням в теплій воді, у 14,3% – розморожування на повітрі при кімнатній температурі та у 14,3% випадків використовується лабораторна водяна баня (рис.1).



Рис. 1. Сумська обласна клінічна лікарня

У Сумській центральній міській лікарні №1 у 50% проводиться розморожування та підігрів на водяній бані та у 50% – на повітрі при кімнатній температурі (рис. 2).

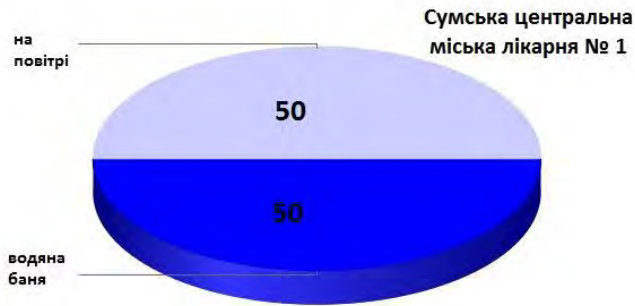


Рис. 2. Сумська центральна міська лікарня №1

У Сумській міській клінічній лікарні №5 у 60% випадків проводять розморожування при кімнатній температурі на повітрі, а у 40% – на водяній бані (рис. 3).



Рис. 3. Сумська міська клінічна лікарня №5

На основі отриманих даних, можна визначити загальну тенденцію розповсюдження методів підготовки компонентів крові до гемотрансфузії. Так, в 6,25% використовується лабораторна водяна баня, в 31,25% – використовують звичайні водяні бані, в 31,25% – проводить розморожування при кімнатній температурі на повітрі, а в 31,25% – в теплій воді, при температурі 36,6-37,0°C (рис. 4).

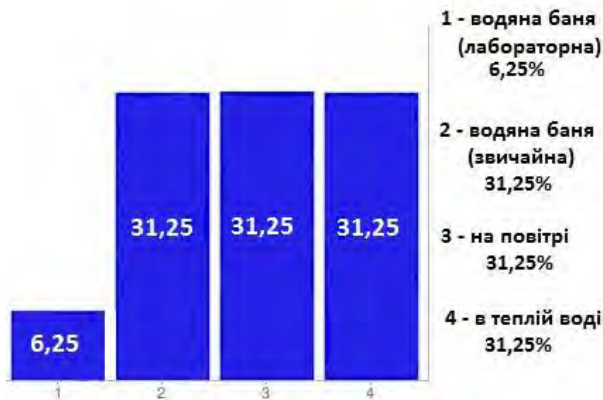


Рис. 3. Методи розморожування плазми в медичних закладах міста Суми

Обговорення результатів. На сьогодні в Україні найбільш широко використовується розморожувач плазми PLAZMA SOFT. Згідно інформації отриманої з офіційних джерел, ціна одного такого апарату сягає 171 400 грн.

Враховуючи сучасний стан фінансування медичної галузі та потребу у таких розморожувачах, можна очікувати, що в найближчий час не відбудеться повне забезпечення відділень лікарень необхідним устаткуванням. А це означає, що дана ланка залишиться найкритичнішою у ланцюгу надання якісної трансфузіологічної допомоги.

Необхідно відмітити, що на даний час в Україні існує запатентований розморожувач плазми крові, якість роботи якого не поступається закордонним аналогам.

У разі налагодження виробництва вітчизняних розморожувачів плазми, можливо досягти повного забезпечення відділень лікарень, та вирішити таким чином одне з найактуальніших питань української гемотрансфузіології.

Висновки. Враховуючи отримані результати, необхідно зазначити, що проблема відсутності спеціальних розморожувачів плазми є однією з найактуальніших у сфері гемотрансфузіології. У разі забезпечення відділень лікарень сучасними вітчизняними апаратами для розморожування, можливо було б досягнути вищої якості надання медичної допомоги за рахунок зменшення гемолізу компонентів крові, збереження рівня факторів згортання крові та суттєвого підвищення ефективності лікування. Саме тому, проблема

неналежного устаткування на етапі розморожування та підігріву компонентів крові потребує негайного вирішення на державному рівні.

Література

1. Жибурт Е. Б. Первый опыт аудита трансфузий свежемороженой плазмы/ Е. Б. Жибурт, Е. А. Шестаков, А. А. Вергопуло // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2009. – Т.4, №1. – С.20-23.

2. Донорська плазма. Препарати плазми крові та їх клінічне застосування: Посібник для лікарів/ В. Л. Новак, П. В. Гриза, С. В. Примак. – Д.: АРТ-ПРЕС, 2011.

3. Allele Frequency Net Database. AFND; Available at: <http://www.allelefreqencies.net> (accessed 16.06.2015)

4. Шиффман Ф. Д. Патофизиология крови. / Шиффман Ф. Д. // М.: Бином, 2014. – 448 с.

5. Рагимов А. А. Трансфузиология. / Рагимов А. А. – М.: Гэотар-Медиа, 2012. – 1184 с.

6. Любчак В. В. Виробнича трансфузіологія / В. В. Любчак, В. П. Любчак, А. С. Тимченко, В. А. Сміянов. – Суми: Держуніверситет. – 2017. – 272 с.

Надійшла 10.11.2017 року.

УДК: 616.151.5;616-003.725:616.155-092-085

ВЛАСТИВОСТІ ТА МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ ФАКТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ VII

С. Є. Мадич, Т. В. Даниш

ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України", Львів

Резюме. Фактор VII використовують при кровотечах і операціях у хворих на гемофілію А або В з інгібіторами до факторів VIII або IX, а також для лікування хворих з вродженим дефіцитом фактора VII. Ми показали, що ряд синтезованих нами сорбентів ефективно зв'язує фактор VII. За допомогою вдало підібраних умов елюції вдалось отримати високоочищений препарат цього білка. Отриманий препарат фактора VII за чистотою та специфічною активністю аналогічний комерційним препаратам відомих виробників. Технологія виділення фактора включає також стадії антивірусної обробки.

Ключові слова: плазма крові, фактор зсідання VII, хроматографічні методи, сорбенти, триазинові барвники.

PROPERTIES AND METHODS OF OBTAINING BLOOD CLOTTING FACTOR VII IN LABORATORY CONDITIONS

S. Madych, T. Danysh

SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine", Lviv

Summary. Factor VII is used in cases of bleeding and operations of patients with haemophilia A or B with inhibitors to VIII or IX and for treatment of patients with the acquire and inherit deficit of VII. We have shown that the row of newly synthesized sorbents effectively links factor VII. With the help of accurate conditions of elution highly-purified preparation of this protein was successfully selected. The received preparation of VII according to its cleanness and specific activeness is analogical to commercial preparations of different producers. Technology of selection of preparation includes the stages of anti-virus treatment.

Key words: blood plasma, blood clotting FVII, chromatographic methods, sorbents, triazine dyes.

Вступ. На сьогоднішній день є актуальною проблема переробки донорської плазми крові з метою створення ефективних лікарських препаратів та діагностичних засобів. Створено значну кількість методів фракціонування плазми крові, виділення та очищення її компонентів, зокрема, факторів зсідання крові та фібринолізу. Вивчення ролі такого фактора зсідання крові, як фактор VII, має теоретичне і практичне значення. Для проведення цих досліджень необхідним є наявність очищених препаратів цього білка. Важливими з точки зору ефективності є методи біоспецифічної хроматографії.

Активація фактора VII (FVII) носить локальний характер [5], тому не викликає системної активації зсідання крові, крім окремих випадків множинних пошкоджень. Препарати FVII використовують при кровотечах і операціях у хворих на гемофілію А або В з інгібіторами до факторів VIII або IX, а також для лікування хворих з вродженим його дефіцитом.

Застосування антикоагулянтів непрямой дії (синкумар, фенілін та ін.) призводить до порушення синтезу в печінці VII, IX, X факторів зсідання крові. Терапія фібринолітичними препаратами викликає порушення в системі зсідання крові.

Оскільки FVII присутній в плазмі в дуже низькій концентрації (близько 0,005 г/л), технології його виділення є складними [3]. Вихідною сировиною для його одержання може також бути концентрат факторів протромбінового комплексу (ППСБ), добутий шляхом попереднього фракціонування плазми [6]. Афінна хроматографія – це перспективний метод для виділення очищеного FVII [1,2,4].

Мета. Підбір вихідної сировини та отримання з неї очищеного FVII методом афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з біоімітуючими барвниками-лігандами, придатного для діагностичних та лікувальних цілей.

Матеріали і методи. Фракції плазми I, II + III чи III за Коном, сольове та поліетиленгліколеве (ПЕГ) фракціонування, афінна хроматографія, електрофорез, макропористий кремнеземний носій, активні тріазинові барвники. Визначення активності FVII проводили фотометричним методом за допомогою гідролізу хромогенного субстрату S-2765 фірми Chromogenix. У дослідженнях використовували референтні нормальні плазми, а також плазми, дефіцитні за факторами II, VII, IX та X (фірма "Cormay"), препарат "NovoSeven" (Novo Nordisk A/S), набір білкових молекулярних маркерів PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, Литва).

Результати та їх обговорення. В нашій лабораторії розробляються методи виділення очищених вірусінактивованих факторів зсідання крові та фібринолізу з продуктів субфракціонування плазми крові за Коном з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних носіях. Використання такої технології дає можливість в один етап отримувати високоочищені терапевтичні кількості вірусінактивованих препаратів практично з утильної сировини станцій переливання крові. Зокрема, наші попередні дослідження показали можливість та достатню ефективність застосування кремнеземних носіїв з тріазиновим барвником – лігандом Активним яскраво-голубим для виділення та очищення тромбіну та фактора

зсідання IX. Оскільки FVII, як і попередні виділені нами ферменти, є сериною протеїназою трипсинового типу, логічною стала необхідність проведення досліджень можливості застосування кремнеземних носіїв з тріазиновими барвниками-лігандами для його виділення та очищення.

Експериментальним шляхом нами доведено, що перевагою кремнеземних сорбентів над органічними при створенні технологій одержання препаратів з плазми крові є висока стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин та стерилізації, можливість застосування високих швидкостей проведення хроматографічного процесу.

В даному дослідженні нами проведено підбір умов визначення вмісту фактора VII у різних субфракціях плазми крові, а також в концентраті ППСБ, з метою виявлення найкращої сировини для його біоспецифічного виділення. Іншим важливим фрагментом даної роботи було створення технології його виділення та очищення з цієї сировини, включаючи етапи антивірусної обробки та афінну хроматографію на кремнеземних сорбентах з лігандами – активними барвниками.

Висновки

1. Низка новосинтезованих макропористих кремнеземних сорбентів з лігандами – активними барвниками ефективно зв'язують фактор VII.
2. Підібрані умови елюювання фактора дозволяють отримувати його специфічно в м'яких фізіологічних умовах.
3. Створена лабораторна схема одержання очищеного фактора зсідання VII, яка включає етапи: сольового та ПЕГ-переосадження, одержання концентрату протромбінового комплексу, вірусну інактивацію, його активацію тромбопластин-кальцієвою сумішшю, та безпосереднє очищення фактора методом афінної хроматографії на макропористому кремнеземному сорбенті з лігандом – активним тріазиновим барвником.

Література

1. Мадич С. Є. Технологічні аспекти виділення фактора VII згортання крові / С. Є. Мадич. // Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. – К., 2015. – Вип. 38. – С. 431-432.
2. Мадич С. Є. Фактор зсідання крові VII: властивості та методи одержання / С.Є. Мадич, Т.В. Даниш.// Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Вип. 73. – С. 310-313.
3. Broze G. J. Purification and properties of human coagulation factor VII / G. J. Broze, P. W. Majerus. // J. Biol. Chem. – 1980. – V.255. – P. 1242-1247.
4. Madych S. Selection and purification of blood clotting factor VII suitable for therapeutic and treatment purposes / S. Madych, T. Danysh.// Thrombosis Research: Proceedings of the 5th International Conference on Thrombosis and Hemostasis Issues in Cancer, Stresa (Lake Maggiore), Italy, April 23–25, 2010. – V. 125. – Suppl. 2. – P. S187.
5. Patthy L. Evolutionary assembly of blood – coagulation proteins/ L. Patthy. // Semin. Thromb. Hemost. – 1990. – V. 16. – P. 245-259.
6. New strategy for the design of ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography./ Sproule K., Morrill P., Pearson J.C. [et al.] // J. Chromatogr. – 2000. – V. 740. – P. 17-33.

Надійшла 09.11.2017 року.

УДК 616.33-088.1-073

ГАСТРОСЦИНТИГРАФІЧНІ ОЗНАКИ МОТОРНО-ЕВАКУАТОРНИХ ПОРУШЕНЬ ШЛУНКУ ПІСЛЯ ХІМІОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ МІСЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ

О. В. Миронова¹, А. Г. Мазур¹, Н. В. Горяїнова²

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ
²ДУ “Інститут гематології та трансфузіології НАМН України”, Київ

Резюме. Мета. Дослідити за допомогою гастросцинтиграфії (ГСГ) порушення моторно-евакуаторної функції шлунку (МЕФШ) у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ) після індукційної хіміотерапії (ХТ).

Матеріали і методи дослідження. У відділенні радіонуклідної діагностики КМКЛ

№14, яке розташоване на базі кафедри радіології та радіаційної медицини НМУ імені О.О. Богомольця, була проведена ГСГ 88 пацієнтам віком 17-73 років (48 чоловікам і 40 жінкам) з ГМЛ після ХТ із відновленим гемопоезом (21-28 доба). Контроль склали 12 пацієнтів гастроентерологічного профілю, які були направлені на ГСГ для уточнення діагнозу і в яких у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту (ШКТ) патології виявлено не було. Хворих досліджували натщесерце на сцинтиляційній гамма-камері ОФЕКТ-1 з радіофармапрепаратом (РФП) ^{99m}Tc -пертехнетат активністю 1МБк/кг. ГСГ представляє собою запис змін швидкості рахунку протягом 30 хвилин з експозицією 1 кадр/хв над шлунком після прийому РФП. Проводилась якісна (розташування, форма, контури, тонус, прохідність шлунку, наявність гастроєзофагеального і дуоденогастрального рефлюксів) і кількісна (час візуалізації всієї порожнини шлунку та початку евакуації РФП з шлунку в кишечник, час половинного спорожнення шлунку, % виведення РФП з шлунку за час дослідження та час появи гастроєзофагеального і дуоденогастрального рефлюксів) оцінка результатів ГСГ.

Результати. В нормі шлунок має чіткі контури, гладкі за малою кривизною і декілька хвилясті за великою. На перших хвилинах дослідження шлунок має форму перевернутої реторти, з повною візуалізацією порожнини до 7-ї хвилини. При нормальному стані МЕФШ протягом 30 хвилин дослідження РФП заповнював петлю 12-палої кишки й частково переходив в тонку кишку. Сповільнення МЕФШ відзначені у більшості пацієнтів (48,9 %), а підвищення цієї функції у 45,5 % обстежених. Гастроєзофагеальний рефлюкс був виявлений у 29 (33 %) обстежених, а дуоденогастральний - у 56 (63,6 %).

Висновки: Головні переваги ГСГ - нескладність виконання, достатньо точна кількісна оцінка показників, що характеризують МЕФШ. ГСГ в оцінці МЕФШ у онкогематологічних хворих може повністю замінити рентгенологічне дослідження. Основними показаннями для проведення ГСГ є наявність у пацієнтів будь-яких ознак функціональної диспепсії або ураження ШКТ. Встановлення типу порушення МЕФШ дає змогу лікарям-гематологам своєчасно та патогенетично обгрунтовано корегувати симптоматичне лікування симптомів гастроінтестинальної токсичності ХТ.

Ключові слова: гастросцинтиграфія, моторно-евакуаторна функція шлунку, радіофармапрепарат, гастроєзофагеальний рефлюкс, дуоденогастральний рефлюкс.

GASTROSCINTIGRAPHIC SIGNS OF MOTOR-EVACUATION DISORDERS OF THE STOMACH AFTER HIMIOTHERAPY IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

O.V. Mironova¹, A.G. Masur¹, N.V. Goryainova²

¹A. A. Bogomolets National Medical University, Kyiv

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Resume. Aim. To investigate with the method of gastroscintigraphy (GSG) the disorder of motor-evacuation function of the stomach (MEFS) in patients with acute myeloid leukemia (GML) after induction chemotherapy (CT).

Materials and methods of research. In the radionuclide diagnostics department, KCCH №14, located on the base of the Department of Radiology and Radiation Medicine of the O.O. Bohomolets, GSG was performed for 88 patients aged 17-73 years (48 men and 40 women) with GML after CT with restored hemopoiesis (21-28 days). The control consisted of 12 patients with gastrointestinal disorders who were directed to the GSG to clarify the diagnosis and in which there

was no pathology in the upper gastrointestinal tract (GIT). The patients were examined on an empty stomach on a scintillation gamma camera OFEKT-1 with radiopharmaceuticals (RPP) ^{99m}Tc -pertechnetate with activity of 1 MB/kg. GSG is a record of changes in the speed of the account for 30 minutes with an exposure of 1 frame/min above the stomach after receiving RPP. Qualitative (location, shape, contours, tone, stomach passability, presence of gastroesophageal and duodenogastric reflux) and quantitative (time of visualization of the entire cavity of the stomach and the beginning of evacuation of the RPP from the stomach into the intestine, half of the stomach emptying, % withdrawal of RPP from the stomach during the study and the time of occurrence of gastroesophageal and duodenogastric reflux) evaluation of the results of GSG.

Results: Normally, the stomach has clear contours that are smooth in low curvature and somewhat wavy in large. At the first minute of the stomach study, it has the form of an inverted retort, with a full visualization of the cavity to the 7th minute. In the normal state of MEFS for 30 minutes, the RPP filled the loop of the 12th-small intestine and partially passed into the small intestine. The decreasing of MEFS was noted in most patients (48.9%), and the increasing in this function was observed in 45.5% patients. Gastroesophageal reflux was detected in 29 (33%) patients, and duodenogastric in 56 (63.6%).

Conclusions: The main advantages of GSG is the simple implementation, the precise quantification of the indicators characterizing the MEFS. GHG in the evaluation of MEFS in oncohematological patients can completely replace X-ray examination. The main indication for GSG is the presence of any signs of functional dyspepsia or gastrointestinal tract disorders in patients. Establishing the type of violation of the MEFS allows the hematologists to timely and pathogenetically substantiate the correction of symptomatic treatment of symptoms of gastrointestinal toxicity of CT.

Key words: gastroscintigraphy, motor-evacuation function of the stomach, radiopharmaceutical, gastroesophageal reflux, duodenogastric reflux.

Вступ. Очевидними ознаками гастроінтестинальної токсичності індукційної хіміотерапії (ХТ) у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ), яка спостерігається майже у 97% хворих [2], є нудота, блювання, проноси, ураження слизової оболонки порожнини рота та травного тракту. Але часто поза увагою лікарів залишаються порушення моторно-евакуаторної функції шлунку (МЕФШ), своєчасна корекція яких значно зменшує важкість і тривалість неприємних симптомів. Більш ніж у 60% хворих ці порушення проявляються «шлунковою дисритмією», а у 40% - змінами акомодатії шлунку з послабленням моторики антрального відділу і наступним гастропарезом [3, 4].

МЕФШ залежить від низки факторів: функціонального стану ворота, кислотності вмісту, тону, ритму перистальтики. Але ці показники можуть змінюватися під дією хіміопрепаратів, які використовуються для лікування злоякісних захворювань системи крові.

Метод гастросцинтиграфії (ГСГ) на сьогодні є «золотим стандартом» у виявленні функціональних порушень верхніх відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ), який дозволяє отримати як якісні, так і кількісні параметри [1]. Такі його переваги як неінвазивність, відсутність спеціальної підготовки пацієнта, невелике променеве навантаження до 1,0 мЗв (при гранично допустимій дозі опромінення для категорії пацієнтів АД в Україні 100 мЗв/рік), дозволяє його проводити практично всім онкогематологічним пацієнтам [6].

Мета. Дослідити за допомогою гастросцинтиграфії порушення моторно-евакуаторної функції шлунку у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію після індукційної хіміотерапії.

Матеріали і методи дослідження. У відділенні радіонуклідної діагностики КМКЛ №14, яке розташоване на базі кафедри радіології та радіаційної медицини НМУ імені О.О. Богомольця, була проведена ГСГ 88 пацієнтам віком від 17 до 73 років (48 чоловікам і 40 жінкам) з ГМЛ в першому гострому періоді після закінчення курсів індукційної ХТ і виході з гранулоцитопенії з відновленням гемопоезу (21-28 доба). Всі хворі перебували на лікуванні в період з 2007 до 2017 рр. в КМКЛ № 9 у гематологічному відділенні №1, яке є клінічною базою відділення захворювань системи крові ДУ „Інститут гематології та трансфузіології НАМН України”. Контроль склали 12 пацієнтів гастроентерологічного відділення, які були направлені на ГСГ для уточнення діагнозу та в яких у верхніх відділах ШКТ патології виявлено не було.

Хворих обстежували натщесерце на сцинтиляційній гамма-камері ОФЕКТ-1 з комп'ютерним програмним забезпеченням. В якості харчового субстрату використовувалась ряжанка об'ємом 200 мл з радіофармпрепаратом (РФП) ^{99m}Tc -пертехнетат з розрахунку 1 МБк на 1 кг ваги пацієнта. Найкраще положення хворого - сидячи обличчям до детектора гамма-камери, який розташовувався паралельно передній поверхні тіла.

ГСГ складалась з 2-х етапів. Перший (езофагосцинтиграфія) полягав в зовнішньому детектуванні змін швидкості рахунку протягом 20 секунд з експозицією 1 кадр/с над ділянкою стравоходу після першого максимального ковтка РФП. На другому етапі (безпосередньо ГСГ) після прийому залишку РФП запис інформації змін швидкості рахунку протягом 30 хвилин з експозицією 1 кадр/хв продовжувався над шлунком. Оцінка даних ГСГ складалась з якісної оцінки розташування, форми, контурів, тону, прохідності шлунку, наявності гастроєзофагеального і дуоденогастрального рефлюксів.

Після вибору певних зон шлунку (дно, тіло, препілорична ділянка) або верхніх відділів кишечника оцінювали кількісні параметри ГСГ:

1. Час візуалізації всієї порожнини шлунку (хв.). В нормі: 5-7-а хвилина. Якщо вся порожнина шлунку не візуалізується до 8-ї хвилини - непряма ознака гіпертону (можливого спазму або локального звуження). При візуалізації порожнини шлунку до 5-ї хвилини – ознака гіпотону.

2. Час початку евакуації РФП у кишечник (Т, хв.). В нормі перший викид спостерігається на 3-5-й хвилині. При $T > 7$ хвилин - уповільнення евакуації (гіпомоторика), при $T < 3$ хвилин - прискорення евакуації РФП (гіпермоторика).

3. Час половинного спорожнення шлунку ($T_{1/2}$ хв.). В нормі $25,5 \pm 0,5$ хвилин. При $T_{1/2} < 25$ хвилин - прискорена евакуація, при $T_{1/2} > 30$ хвилин - уповільнена.

4. Виведення РФП зі шлунку за 30 хвилин (оцінка МЕФШ) у відсотках. В нормі - 50%. При 35-45% - незначне уповільнення евакуаторної здатності, при 25-35% - середнє уповільнення евакуації, $< 25\%$ - значне уповільнення евакуації. При значеннях $> 50\%$ - прискорена евакуація.

5. Час появи гастроєзофагеального і дуоденогастрального рефлюксів, сцинтиграфічні ознаки яких - це протифазні зміни відповідних кривих у визначений час дослідження.

Результати та їх обговорення. В нормі шлунок має чіткі контури, гладкі за малою кривизною і дещо хвилясті за великою. На перших хвилинах

дослідження шлунок має форму перевернутої реторти, з повною візуалізацією порожнини до 7-ї хвилини. При нормальному стані МЕФШ протягом 30 хвилин дослідження РФП заповнює петлю 12-палої кишки й частково переходить у тонку кишку (рис. 1).

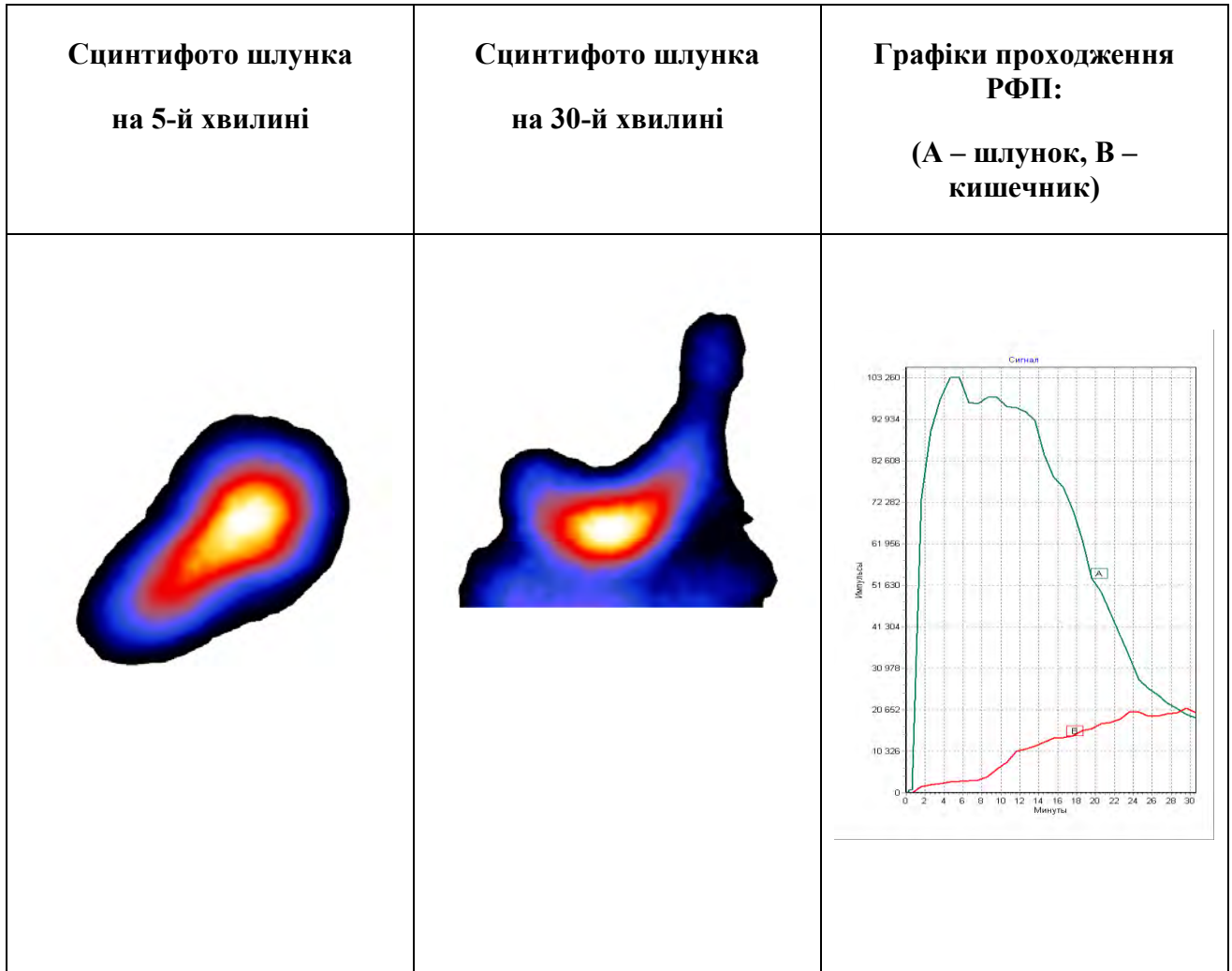


Рис. 1. Гастросцинтиграфія в нормі.

Сцинтифото шлунку на 5-й хвилині	Сцинтифото шлунку на 30-й хвилині (форма «рибальського гачка»)	Криві над ділянкою антрального відділу шлунку (А) і кишечника (В)
-------------------------------------	--	---

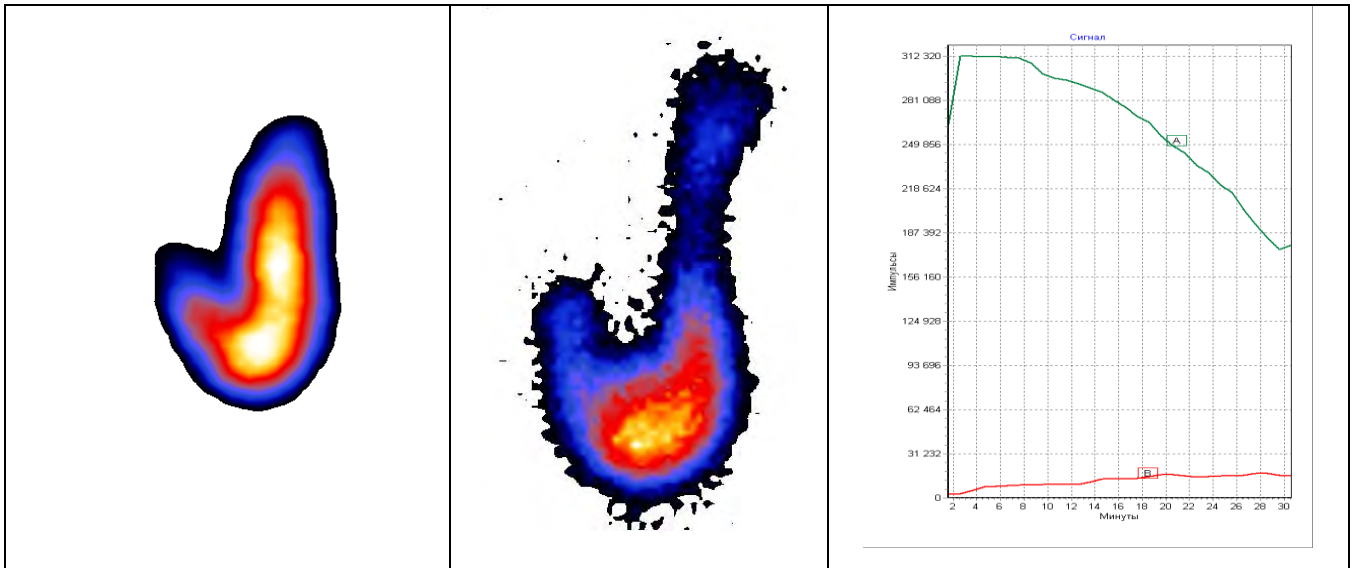


Рис. 2. Гастросцинтиграфія при гіпотонусі шлунку.

Сповільнення МЕФШ відмічалось у 43 (48,9%) обстежених, що спостерігалось як при гіпотонічному, так і при гіпертонічному станах або локальній деформації. Гіпотонус виявився у 19 (44,2%) пацієнтів, що сцинтиграфічно виявлялося ранньою візуалізацією (на 3-й хвилині дослідження) всієї порожнини шлунку з формою «рибальського гачка». Контури шлунку були чіткі й рівні. За час обстеження виводилось $\leq 35\%$ РФП (середнє уповільнення) при надходженні РФП у кишечник на 20-27-й хвилині (рис. 2).

Візуалізація порожнини шлунку після 8-ї хвилини дослідження (гіпертонус) спостерігалась у 22 (51,2%) обстежених. Шлунок мав форму «рога» і в більшості випадків його порожнина не візуалізувалася до кінця дослідження. За час ГСГ зі шлунку виводилось не більше 25% РФП (що відповідало значному уповільненню евакуації), з часом надходження в кишечник на 25-й хвилині (рис. 3).

<p>Сцинтифото шлунка на 5-й хвилині</p>	<p>Сцинтифото шлунка на 30-й хвилині</p>	<p>Криві над ділянкою антрального відділу шлунка (А) і кишечника (В)</p>
---	--	--

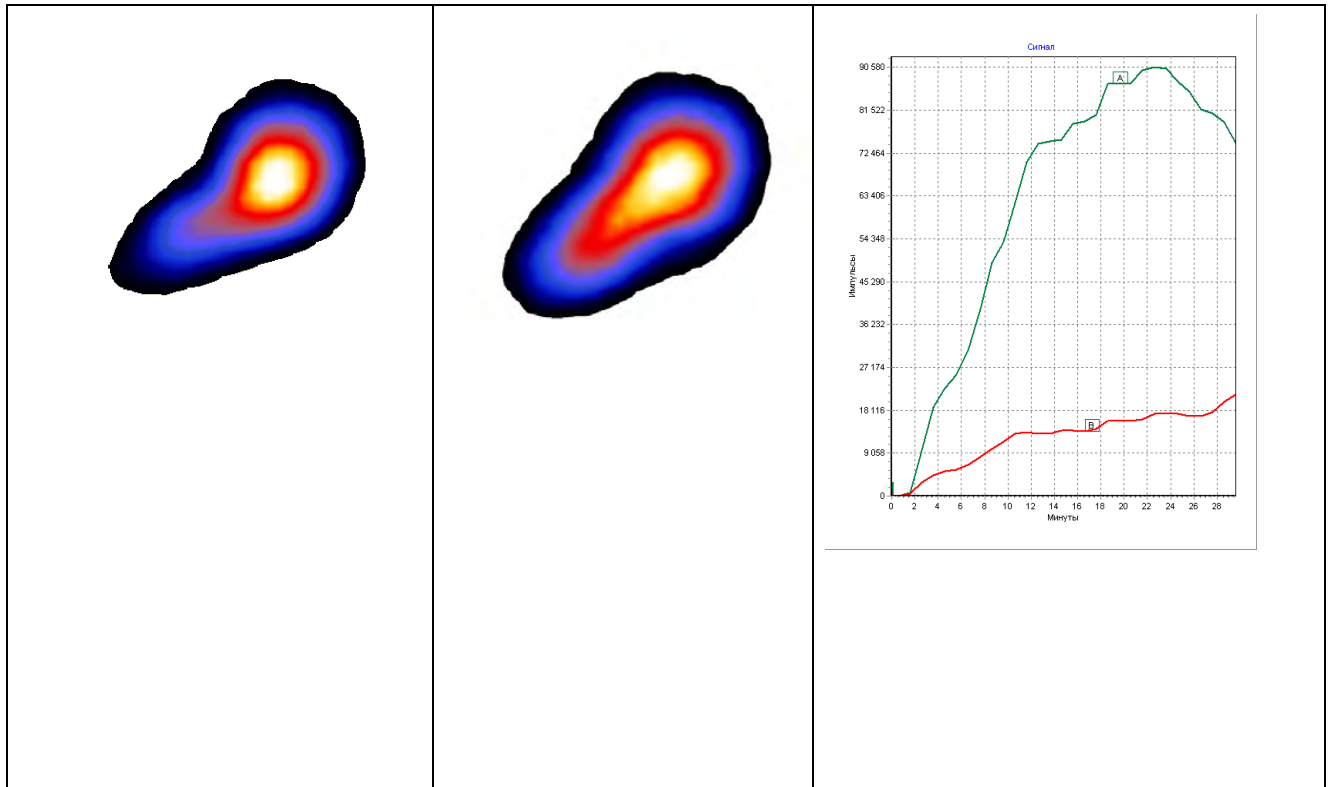


Рис. 3. Гастросцинтиграфія при гіпертонусі шлунку.

Деформація порожнини шлунку спостерігалась у 4 (4,5%) пацієнтів: у 2 (2,3%) із виразкою шлунку, у 2 (2,3%) – з виявленими ураженнями шлунку у вигляді екзофітного росту тіла шлунку (1) та дифузного росту (скіпп) антрального відділу (1). У двох із досліджуваних було виявлено сповільнення МЕФШ по гіпертонічному, і у двох по гіпотонічному типу (рис. 4).

Підвищення МЕФШ відмічалось у 40 (45,5%) пацієнтів, у яких за 30 хвилин обстеження вивелось понад 50% РФП. Час надходження в кишечник спостерігався вже на 3-й хвилині.

Як свідчать отримані дані, лише у 5 пацієнтів (5,7%) не було виявлено зміни з боку МЕФШ.

Локальне звуження в середній частині тіла шлунку	Дифузне звуження в верхній частині шлунку	Локальне звуження в верхній частині	Локальне звуження в середній частині
--	---	-------------------------------------	--------------------------------------

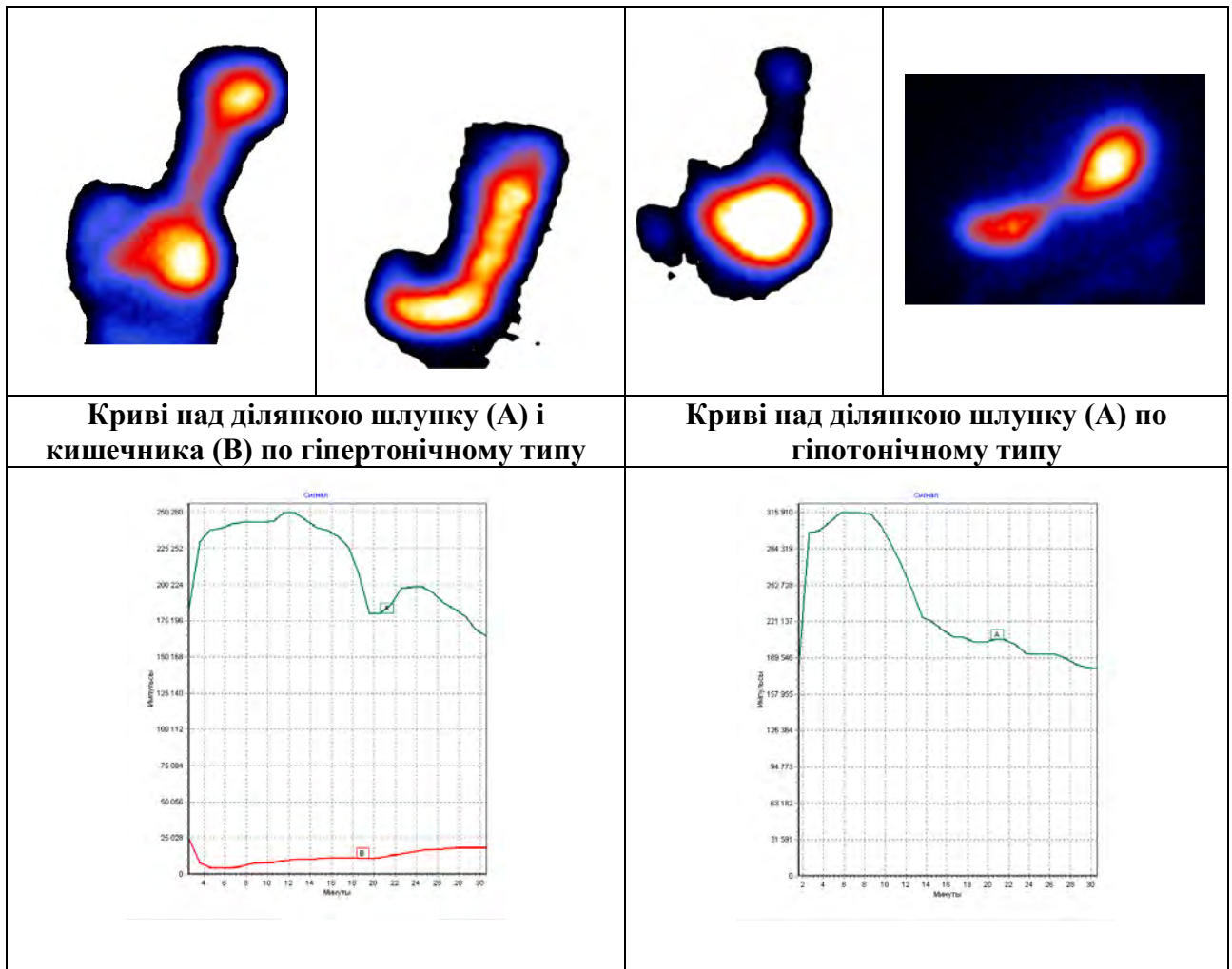


Рис. 4. Скintiфото шлунку при його деформації. Графічне відображення проходження РФП по шлунку при гіпер- та гіпотонії.

Кількість та співвідношення виявлених функціональних порушень ШКТ серед обстежених хворих на ГМЛ наведені у таблиці.

Гастроезофагальний рефлюкс на фоні інших ознак МЕФШ та проявів гастроінтестинальної токсичності було виявлено у 29 (33%) обстежених хворих на ГМЛ. Дуоденогастральний рефлюкс зареєстровано у 56 (63,6%) пацієнтів (рис. 5).

Таблиця – Розподіл обстежених пацієнтів за виявленими функціональними порушеннями верхніх відділів ШКТ

Функціональні порушення верхніх відділів ШКТ	Кількість пацієнтів	
	Абсолютна	%
Уповільнення МЕФШ:	43	48,9
За гіпотонічним типом	19	21,6

За гіпертонічним типом	24	27,3
Підвищення МЕФШ	40	45,5
Гастрозофагеальний рефлюкс	29	33
Дуоденогастральний рефлюкс	56	63,6
Без функціональних порушень верхніх відділів ШКТ	5	5,7

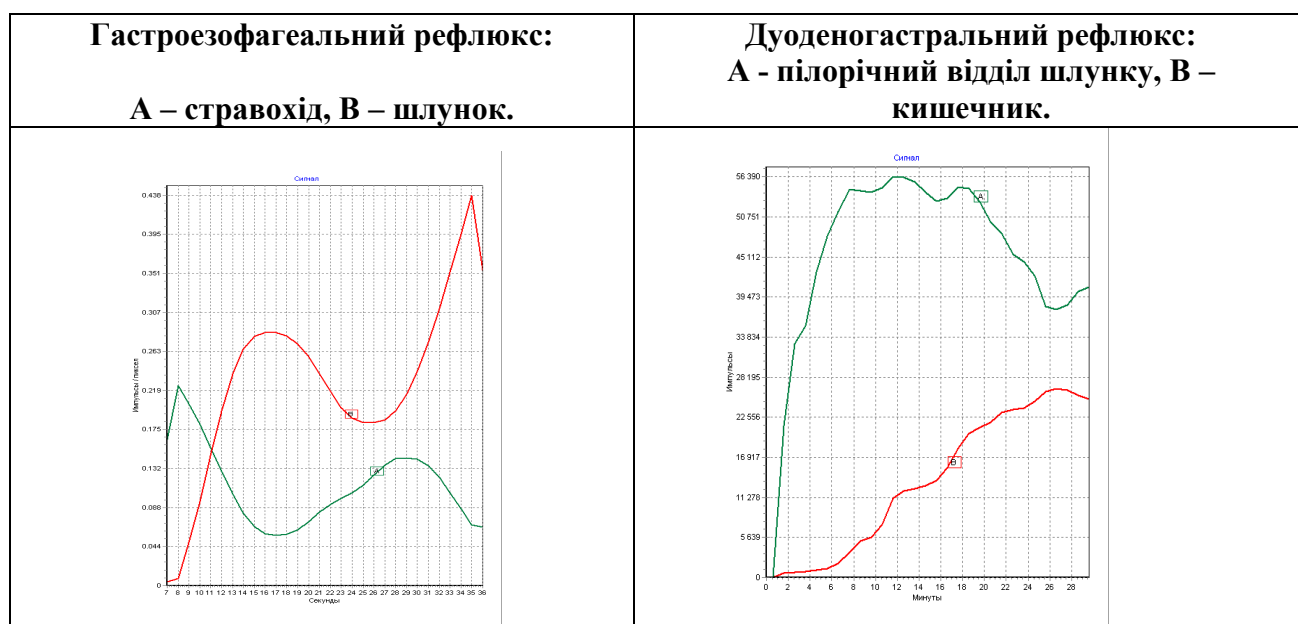


Рис. 5. Графічне відображення рефлюксів при гастросцинтиграфії.

Висновки

1. Головні переваги ГСГ - нескладність виконання, достатньо точна кількісна оцінка показників, що характеризують МЕФШ.
2. ГСГ в оцінці МЕФШ у онкогематологічних хворих може повністю замінити рентгенологічне дослідження.
3. Основними показаннями для проведення ГСГ є наявність у пацієнтів будь-яких ознак функціональної диспепсії.
4. Встановлення типу порушення МЕФШ дає змогу лікарям-гематологам своєчасно та патогенетично обґрунтовано корегувати симптоматичне лікування симптомів гастроінтестинальної токсичності ХТ.

Література

1. Миронова Е. В. Динамическая гастросцинтиграфия в оценке моторно-эвакуаторной функции желудка // Містечтво лікування. – № 4 (60). – 2009. – С. 87-90.
2. Эффективность лечения острого миелобластного лейкоза с использованием протокола FLAG / Третьяк Н. Н., Горяинова Н. В., Киселева Е. А. [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – № 2 (28). – С. 95–100.
3. Usefulness of gastroesophageal reflux scintigraphy using the knee-chest position for the diagnosis of gastroesophageal reflux disease/ Asakura Y., Imai Y., Ota S. [et al]. //Ann. Nucl. Med. – 2015. – V. 19. – P. 291-296.
4. Extending gastric emptying scintigraphy from two to four hours detects more patients with gastroparesis/ Guo J.P., Maurer A.H., Urbain J.L. [et al]. // Dig Dis Sci. – 2001. – V. 46. – P. 24 - 29.
5. Usefulness of ^{99m}Tc-sestamibi scintigraphy in suggesting the therapeutic effect of chemotherapy against gastric cancer / Kawata K., Kanai M., Sasada T. [et al]. // Br. J. Radiol. – 2005. – V. 78. – P. 714 - 720.
6. Maurer A. H., Parkman H. P. Update on gastrointestinal scintigraphy/ Maurer A. H., Parkman H. P. // Semin Nucl Med . – 2006. – V. 36. – P. 110-118.
7. Comparison of gastric emptying scintigraphy based on the geometric mean of the gastric proportion of the abdominal radioactivity or on the geometric mean of the intragastric radioactivity / Salaun P. Y., Querellou S., Nguyen J. M. [et al]. // Nucl Med Commun. – 2006. – V. 27. – P. 431-437.

Надійшла 30.10.2017 року.

УДК: 616.155.392:616.34+576.8.06

**ДИСБІОТИЧНІ ЗМІНИ МІКРОБІОТИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО
ТРАКТУ У ХВОРИХ НА ГОСТРУ ЛЕЙКЕМІЮ ТА ШЛЯХИ ЇЇ
ВІДНОВЛЕННЯ**

Л. М. Немировська, Ю. С. Пономаренко, А. П. Рибальська, М. М. Мазур

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. Вступ. Актуальність проблеми дисбактеріозу кишечника у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ) визначається необхідністю нормалізувати мікроекологію біотопу, мікробіота якого змінюється під впливом хіміотерапевтичних препаратів та на тлі імунodefіциту може провокувати інфекційно-запальні процеси. У практичному плані визначення стану нормальної мікрофлори кишечника хворих та корекція її за рахунок пробіотичних препаратів має важливе значення для покращення лікувального процесу.

Мета. Дослідити стан мікрофлори біотопу кишечника хворих на ГМЛ та визначити можливість її відновлення за допомогою пробіотичного препарату.

Матеріали та методи. Об'єкти дослідження – хворі на ГМЛ (7 осіб), пробіотик, що містить стартерні культур: не менше 1×10^8 колонієутворюючих одиниць в 1 г (КУО/г) *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*; не менше 3×10^7 КУО/г *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*; не менше 1×10^7 КУО/г *Propionibacterium freudenreichii*. Дослідження стану мікрофлори кишечника хворих у динаміці пробіотикотерапії проведено класичним методом.

Результати. На початку курсу пробіотикотерапії популяція кишечника хворих на гостру мієлоїдну лейкемію характеризувалася відсутністю кишкової палички *Escherichia coli* з нормальною фізіологічною активністю, факультативно-анаеробних бактерій роду *Lactobacillus* та анаеробів роду *Bifidobacterium*, наявністю в окремих осіб умовно патогенних бактерій *Proteus mirabilis* (2×10^6 КУО/г) і *Klebsiella pneumoniae* (3×10^6 КУО/г), кількість яких перевищувала фізіологічну норму. Після закінчення курсу пробіотикотерапії рівень відновлення мікроорганізмів окремих родів і видів мав індивідуальний характер. У цілому результати дослідження свідчать про позитивну динаміку відновлення мікроекології біотопу кишечника.

Висновки. Мікрофлора кишечника хворих на ГМЛ, які приймають курси протипухлинної терапії, зазнає дисбіотичних порушень. Вживання протягом двох тижнів пробіотичного препарату хворими на ГМЛ частково сприяє відновленню нормофлори біотопу. Термін застосування пробіотика, що становив два тижні, є недостатнім для повного відновлення мікробіоти біотопу.

Ключові слова: хворі на гостру мієлоїдну лейкемію, дисбактеріоз, кишечник, пробіотик, мікроорганізми.

DYSBIOTIC CHANGES OF MICROBIOTA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA AND WAYS OF ITS RECOVERY

L. M. Nemyrovska, Y. S. Ponomarenko, A. P. Rybalska, M. M. Mazur

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Resume. Introduction. The urgency of the problem of intestinal dysbiosis in patients with acute myeloid leukemia (AML) is determined by the need to improve the microecology of the biotope, the microbiote of which suffers from the influence of chemotherapeutic drugs and against the background of the immune deficiency can provoke infectious and inflammatory processes. In practical terms, the determination of the state of normal intestinal microflora in patients and its correction due to probiotic drugs is essential for improving the therapeutic process.

Aim. To investigate the state of the microflora of the intestinal biotope in patients with AML and to determine the possibility of its recovery through a probiotic drug.

Materials and methods. *Objects of study - patients with AML (7 persons), probiotic, containing starter cultures: at least 1×10^8 CFU/g Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium adolescentis; at least 3×10^7 CFU/g Streptococcus salivarius, Lactobacillus acidophilus; not less than 1×10^7 CFU/g Propionibacterium freudenreichii. The state of intestinal microflora of patients in the dynamics of probiotic therapy was investigated by the classical method.*

Results. *At the beginning of the course of probiotic therapy, the intestinal population of patients with AML was characterized by the absence of Escherichia coli with normal physiological activity, facultative anaerobic bacteria of the genus Lactobacillus and anaerobes of the genus Bifidobacterium, the presence of opportunistic bacteria Proteus mirabilis (2×10^6 CFU/g) and Klebsiella pneumoniae (3×10^6 CFU/g) that exceeded the physiological norm. At the end of the course of probiotic therapy, the level of recovery of microorganisms of individual genera and species was individual. In general, the results of the study indicate a positive dynamic of the restoration of microecology of the intestinal biotope.*

Conclusions. *Intestinal microflora of patients with AML, who take courses in antitumor therapy, undergoes dysbiotic disorders. Use within two weeks of a probiotic drug in patients with GML who take courses in antitumor therapy, helps to restore normal flora habitat. The use of probiotics, which is two weeks, is not sufficient for the complete restoration of the microecology of the biotope.*

Key words: *patients with acute myeloid leukemia, dysbiosis, intestines, probiotics, microorganisms.*

Вступ. Проблема дисбактеріозу кишечника до теперішнього часу є актуальною і потребує уваги дослідників. Зокрема, у хворих на гостру лейкемію внаслідок впливу хіміотерапевтичної терапії порушується мікроекологія біотопів і в першу чергу – кишечника, що призводить до розвитку дисбіотичних змін та на тлі імунодефіциту провокує інфекційно-запальні процеси. У практичному плані визначення стану нормальної мікрофлори кишечника хворих та корекція її за рахунок пробіотичних препаратів має важливе значення для покращення лікувального процесу.

Термін «дисбактеріоз кишечника» означає якісну і кількісну зміну нормальної кишкової мікрофлори, зокрема, співвідношення її видів. Останнім часом широко використовується термін "дисбіоз кишечника" (лат. "дис" - порушення, розлад, "біос" – життя). Відомо, що кишкова мікрофлора бере участь у формуванні місцевого і системного імунітету за рахунок стимуляції продукції IgA, активації фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів, виробленні цитокінів мононуклеарами, біологічно активних речовин, що руйнують антигени. Саме наявність мікрофлори надає постійний антигенний

захист. Участь мікрофлори кишечника в регуляції обміну холестерину, оксалатів та інших вторинних метаболітів визначає її важливу роль, що виходить за межі шлунково-кишкового тракту. Все це дозволяє виділити її як самостійний орган [3,4,5,9]. Наукові дані свідчать про зв'язок кишкового мікробіоценозу зі захворюваннями травного тракту, серцево-судинної системи, ожирінням, цукровим діабетом, злоякісними новоутвореннями шлунка, товстої кишки та алергічними, аутоімунними хворобами [6,7, 8].

Дисбіоз кишечника різної локалізації може визначати розвиток або впливати на перебіг гіперхолестеринемії, коагулопатії, системного захворювання сполучних тканин, порушення водно-сольового, вуглеводного і пуринового обмінів, гострої мезентеріальної ішемії, спонтанного бактеріального перитоніту, печінкової енцефалопатії тощо. Тому дисбіоз кишечника представляє собою не тільки медичну, а й соціальну проблему [1, 2]. Дисбактеріоз не є самостійним захворюванням, а завжди вторинний, виникає в результаті дії певного шкідливого фактора або внаслідок захворювання та є складним клініко-мікробіологічним синдромом, виявлення якого не можливо без ретельно проведеного мікробіологічного дослідження.

Мета дослідження: у процесі протипухлинної терапії хворих на гостру мієлоїдну лейкемію визначити стан мікрофлори біотопу кишечника та можливість її відновлення за допомогою пробіотичного препарату.

Дослідження проведено у межах НДР на базі відділення захворювань системи крові ДУ «ІГТ НАМН».

Матеріали та методи. Об'єктом обстеження були 7 хворих на гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ), в яких у динаміці пробіотикотерапії було досліджено мікрофлору кишечника та проведено корекцію кишкової мікробної популяції за допомогою вітчизняного пробіотичного препарату, що містить стартерні мікробні культури: не менше 1×10^8 КУО/г *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*; не менше 3×10^7 КУО/г *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*; не менше 1×10^7 КУО/г

Propionibacterium freudenreichii. Дози вживання пробіотика відповідали інструкції виробника. Пробиотик містить живі мікроорганізми, що позитивно впливають на здоров'я людини, нормалізують склад і функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту, зокрема, перетворюють лактозу на молочну кислоту. Це служить консервантом завдяки зниженню рН і створенню несприятливих умов для росту інших мікроорганізмів.

Матеріал для дослідження (фекалії) доставляли до лабораторії без консерванту не пізніше 2 годин з моменту відбору зразка у стерильному скляному посуді (чашки Петрі) у кількості до 20 грамів. Дослідження здійснювали за класичним методом десятикратних розведень з висівом 1 г матеріалу на щільні та напіврідкі поживні середовища: Ендо, ЖСА, ЖЕСА, Сабуро, 5% кров'яний агар, вісмут–сульфітний агар, Блаурока. Фізіолого-біохімічні ознаки досліджували на середовищах Олькеницького, Симонса, Кларка, Гісса з лактозою і манітом. Морфологічні ознаки, кількісний та видовий склад ізолюваних мікробних культур оцінювали за параметрами фізіологічної норми та за визначником бактерій Бергі [10,11,12].

Результати та їх обговорення. Результати свідчать, що на початку дослідження у кишечній популяції хворих на ГМЛ переважають *Escherichia coli* зі зниженою ферментативною активністю (ЗФА), у переважній кількості (5 осіб) – не було виявлено факультативно-анаеробних бактерій роду *Lactobacillus*, у трьох – анаеробів роду *Bifidobacterium*. Кокові культури *Staphylococcus epidermidis* ($1-4 \times 10^4$ КУО/г) ізолювали з біотопу двох пацієнтів. Умовно патогенні бактерії (УПБ) виявлено у двох пацієнтів: з біотопу однієї хворої ізолювали α -гемолітичний штам *Enterobacter cloacae* (6×10^8 КУО/г), іншої хворої – одночасно ізолювали два види: *Proteus mirabilis* і *Klebsiella pneumoniae* ($2-3 \times 10^6$ КУО/г), кількість яких перевищувала фізіологічну норму. У кишечнику чотирьох хворих було виявлено дріжджі роду *Candida*, проте у межах фізіологічної норми (1×10^4 КУО/г). Взагалі мікрофлора кишечника усіх

хворих не відрізнялася різноманітністю, на відміну від мікробіоценозу практично здорових осіб (табл.1, рис.1, 2).

Таблиця 1 – Характеристика мікрофлори кишечника хворих на лейкемію на початку вживання пробіотичного препарату

Мікроорганізми, кількість, норма [11]	Хворі; титр мікроорганізмів, КУО/г						
	С.	П.	Л.	М.	К.	Ш.	ПП.
Escherichia coli, НФА, 10 ⁶ х10 ⁸ КУО/г	Нв	1х10 ⁸	7х10 ⁸	2х10 ⁷	Нв	Нв	4х10 ⁷
Escherichia coli, ЗФА, 10 ⁶ КУО/г	Нв	Нв	Нв	Нв	2х10 ⁶ α- гемолі з	Нв	5х10 ⁶
УПБ, до 10 ⁴ х10 ⁵ КУО/г	Enterobacte r cloacae α- гемоліз,6х1 0 ⁸	Нв	Нв	Нв	Нв	Нв	P. mirabilis, 2х10 ⁶ K.pneumoni ae 3х10 ⁶
Staphylococcus, до 10 ⁴ КУО/г	S.epidermid is 1х10 ⁴	S.epidermid is 4х10 ⁴	Нв	Нв	Нв	Нв	Нв
Bifidobacterium, ≥10 ⁸ КУО/г	Нв	2х10 ⁸	1х10 ⁷	3х10 ⁸	Нв	Нв	2х10 ⁸
Lactobacillus, ≥10 ⁸ КУО/г	Нв	Нв	Нв	Нв	5х10 ⁸	Нв	2х10 ⁷
Enterococcus, 10 ⁶ х10 ⁸ КУО/г	1х10 ⁹	Нв	1х10 ⁷	Нв	5х10 ⁸	1х10 ⁷	1х10 ⁸
Candida, 10 ³ х10 ⁴ КУО/г	Нв	Нв	2х10 ⁴	2х10 ⁴	Нв	1х10 ⁴	1х10 ⁴

Примітка: НФА - кишечна паличка з нормальною ферментативною активністю; ЗФА - кишечна паличка зі зниженою ферментативною активністю; Нв – не виявлено.

Таблиця 2 – Характеристика мікрофлори кишечника хворих на лейкемію після закінчення курсу вживання пробіотичного препарату

Мікроорганізми, кількість, норма [11]	Хворі; титр мікроорганізмів, КУО/г						
	С.	П.	Л.	М.	К.	Ш.	ПП.
Escherichia coli, НФА, 10 ⁶ х10 ⁸ КУО/г	3х10 ⁶	Нв	1х10 ⁶	2х10 ⁶	4х10 ⁸	Нд	7х10 ⁷
Escherichia coli,	Нв	1х10 ⁶ β-	Нв	Нв	Нв	-«-	Нв

ЗФА, 10^6 КУО/Г		гемоліз					
УПБ, до $10^4 \times 10^5$ КУО/Г	Enterobacter cloacae, α - гемоліз, 1×10^6	Нв	Proteus mirabilis 1×10^6	Нв	Нв	-«-	P. morganii, 7×10^6
Staphylococcus, до 10^4 КУО/Г	S.epidermidis 6×10^5	Нв	Нв	Нв	Нв	-«-	Нв
Bifidobacterium, $\geq 10^8$ КУО/Г	Нв	Нв	1×10^7	Нв	Нв	-«-	2×10^9
Lactobacillus, $\geq 10^8$ КУО/Г	1×10^8	Нв	1×10^8	1×10^8	1×10^8	-«-	1×10^9
Enterococcus, $10^6 \times 10^8$ КУО/Г	2×10^8	Нв	2×10^8	1×10^8	2×10^8	-«-	1×10^9
Candida, $10^3 \times 10^4$ КУО/Г	6×10^5	4×10^4	Нв	1×10^4	Нв	-«-	Нв

Примітка: НФА - кишечна паличка з нормальною ферментативною активністю; ЗФА - кишечка паличка зі зниженою ферментативною активністю; Нв – не виявлено; Нд – немає даних.

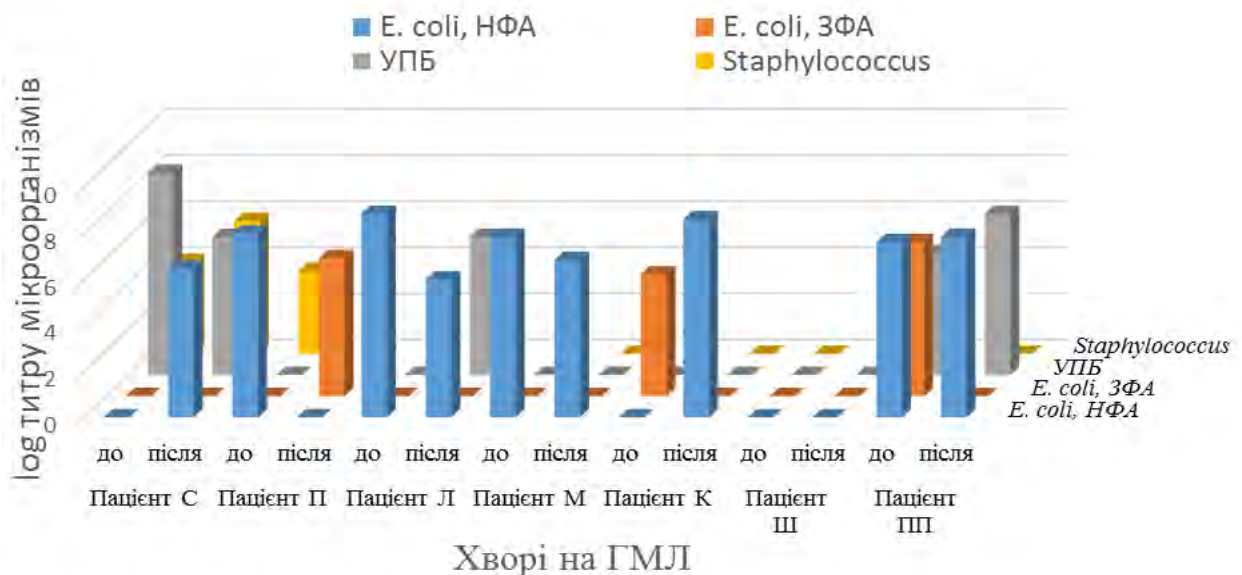


Рис.1 Характеристика мікрофлори хворих на ГМЛ до та після вживання пробіотика.

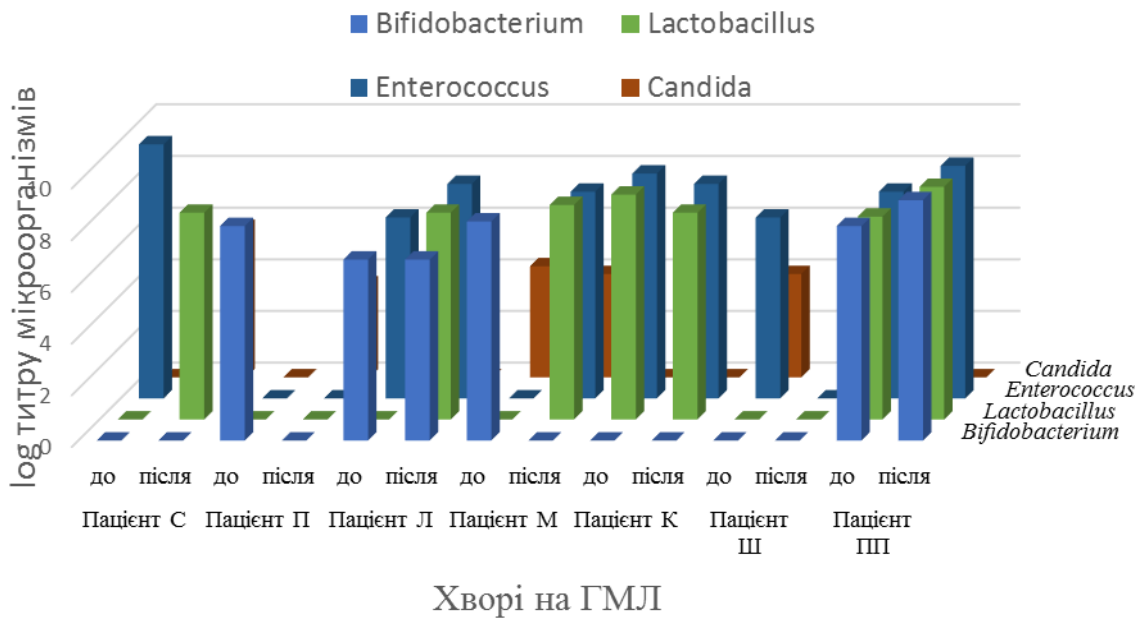


Рис. 2. Характеристика мікрофлори хворих на ГМЛ до та після вживання пробіотики.

Слід зазначити, що після включення хворим до курсу протипухлинної терапії пробіотичного препарату радикальних змін у мікроекології кишечника не відбулося, однак, враховуючи короткий термін вживання пробіотики (два тижні), динаміку змін можна вважати позитивною (табл.2, рис.1, 2). Так, у хворої С. на початку дослідження не було виявлено аеробів кишкової групи, біфідобактерій, лактобактерій. Натомість, переважали кокові культури і УПБ. Після закінчення курсу пробіотикотерапії у мікробіоценозі кишечника у межах фізіологічної норми виявили кишечну паличку *E.coli*, лактобактерії (відповідно, 3×10^6 КУО/г, 1×10^8 КУО/г) та дріжджі роду *Candida*, що також мають бути присутніми у нормоценозі. Якщо кількість *E. cloacae* на початку перевищувала фізіологічну норму та становила 1×10^8 КУО/г, то кінцевий титр цих ентеробактерій зменшився на два порядки порівняно з початковим (1×10^6 КУО/г) і це також можна вважати позитивною тенденцією. Можливо, подовження курсу пробіотикотерапії для хворої С. сприятиме отриманню більш позитивного результату.

З кишечника хворого Л. після вживання пробіотика на фоні відновлення числа лактобактерій (1×10^8 КУО/г) було ізольовано УПБ *P. mirabilis* у кількості, що на два порядки вище фізіологічної норми (1×10^6 КУО/г). Слід зазначити, що ці мікроорганізми засвоюють лактозу і цілком обґрунтовано можуть мешкати у кишечнику здорових людей у межах фізіологічної норми [13].

У хворого М. після курсу пробіотикотерапії виявили факультативні анаероби – лактобактерії і ентерококи (однаково по 1×10^8 КУО/г), які вважаються постійними мешканцями біотопу здорових людей, проте біфідобактерій, що висівалися на початку, виявлено не було. Вочевидь, термін вживання пробіотика був недостатнім.

На початку дослідження у хворі П. виявлено у межах фізіологічної норми кишечну паличку з нормальною ферментативною активністю (1×10^8 КУО/г), біфідобактерії (2×10^8 КУО/г) та *S. epidermidis* (1×10^4 КУО/г), але після курсу пробіотикотерапії не було висіяно навіть цих груп мікроорганізмів, ізолювали тільки β -гемолітичну кишечну паличку (1×10^6 КУО/г) зі зниженою ферментативною активністю і дріжджі роду *Candida* (4×10^4 КУО/г), що свідчить про негативний вплив хіміотерапевтичних препаратів на стан слизової оболонки кишечника пацієнтки та про недостатній рівень відновлення популяції.

Нема даних щодо кінцевих результатів дослідження мікроекології кишечника хворого Ш., оскільки пацієнт помер.

У хворі ПП. на початку дослідження рівень лактобактерій і біфідобактерій був достатньо високим, проте кількість УПБ *P. mirabilis* (2×10^6 КУО/г) і *K. pneumoniae* (3×10^6 КУО/г) перевищувала фізіологічну норму. Після закінчення курсу кишечної палички зі ЗФА не було виявлено, бактерії роду *Klebsiella* з кишечника не висівалися, однак культура протею залишилася. У той же час, кількість мікроорганізмів родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* і *Enterococcus* збільшилася до рівня 10^9 КУО/г, що свідчить про позитивну мікроекологію.

Зміни мікрофлори кишечника хворого К. після закінчення курсу також набули позитивної тенденції, оскільки замість *E. coli* зі зниженою ферментативною активністю (α -гемоліз) висівали фізіологічно активну кишечну паличку. Рівень біфідо- і лактобактерій після закінчення курсу залишився початковим і становив 10^8 КУО/г.

Впродовж прийому пробіотика не було відмічено появи побічних ефектів та скарг хворих.

Таким чином, можливо, нормалізація мікрофлори кишечника, що має сприяти відновленню усіх функціональних груп мікробіоценозу (анаероби, аероби, факультативні анаероби, дріжджі тощо) у фізіологічних межах, може статися за більш тривалий термін.

Висновки

1. Результати дослідження мікрофлори кишечника хворих на гостру мієлоїдну лейкемію свідчать про мікроекологічні порушення популяції біотопу на початку курсу пробіотикотерапії.
2. Застосування протягом двох тижнів пробіотичного препарату, що був включений до схеми протипухлинного лікування хворих на ГМЛ, має позитивну тенденцію щодо відновлення нормофлори біотопу.
3. Характер нормалізації мікрофлори кишечника хворих на ГМЛ є індивідуальним, термін вживання пробіотика, що складає два тижні, є недостатнім для повного відновлення мікроекології біотопу та потребує подовження терміну вживання.

Література

1. Бондаренко В. М. Дисбактеріоз шлунково-кишкового тракту / Бондаренко В. М., Ликовенко І. А. // Український науково-практичний спеціалізований журнал: Сучасна гастроентерологія. – 2012. – № 4 (42). – С. 66-70.
2. Дядик А. І Дисбіоз кишечника та принципи його корекції / Дядик А.І., Чубенко С. С., Гайдуков В. О. // Медичний журнал фармації. – 2012. – № 11. – С. 7-9.

3. Коршунов В.М. Проблема регуляції мікрофлори кишечника / Коршунов В.М. // Ж. Мікробіологія. – 2007. – № 3. – С. 45-48.

4. Костюкевич О.І. Сучасні уявлення про мікробіоценоз кишечника. Дисбактеріоз і методи його корекції / Костюкевич О.І. // РМЖ. – 2007. – № 28. – С. 2176-2182.

5. Передерий В.Г. Синдром раздраженной кишки как самостоятельный диагноз и одно из наиболее распространенных гастроэнтерологических заболеваний./ Передерий В.Г., Ткач С.М., Скопиченко С.В. // 2007. – С. 114-132.

6. Римарчук Г.В. Нарушение микрофлоры кишечника / Римарчук Г.В., Щеплягина Л.А., Круглова И.В., Тюрина Т.К. // Медицинский журнал. — 2009. — № 2. — С. 32.

7. Сидоренко С.В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов / Сидоренко С.В. // Инфекции и антимикробная терапия. – 2009. – № 5. – С. 3–15.

8. Скрипник І.Н. Функціональна роль мікробіоти кишечника і диференційні підходи по корекції порушень мікробіоценозу / Скрипник І.Н. // Здоров'я України. — 2009. — № 6/1. — С. 51-53.

9. Малов В.А. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: современное состояние проблемы / Малов В.А., Гюлазян Н.М. // Лечащий врач. – 2011. – № 6. – С. 10 -13.

10. Метаболизм микроорганизмов. Практикум. / Под ред. Проф. Н.С.Егорова.- М.: Московський университет, 1986. – 253 с.

11. Методические рекомендации по микробиологической диагностике дисбактериозов Київ: МОЗ УРСР, 1986.– 17 с.

12. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]; пер. с англ. Г.А.Заварзина . – М.: Мир, 1997. – 800 с.

13. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism / Goodacre R J.// Nutrilon. – 2007. – V. 5. – P. 259–266.

Надійшла 06.11.2017 року.

УДК 616-006.441-085

**РЕЗУЛЬТАТИ ІМУНОТЕРАПІЇ ТА МІСЦЕВОГО АНТИСЕПТИЧНОГО
ЛІКУВАННЯ УРАЖЕНЬ ШКІРИ ПРИ ГРИБОПОДІБНОМУ МІКОЗІ ТА
СИНДРОМІ СЕЗАРІ**

**В. Л. Новак, Д. М. Курган, М. В. Кокоруз, Ю. В. Деркач, В. Є. Логінський,
С. В. Примак, М. Г. Курган**

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

***Резюме.** В статті проаналізовано результати лікування 64 хворих, з них: 54 пацієнти на різних стадіях грибоподібного мікозу та 10 з синдром Сезарі. Як доповнення до загальнопоширеної терапії Т-клітинних лімфом шкіри (фотоферез) запропоновано оригінальний метод лікування, що включає детоксикацію і посилення захисних імунних реакцій шляхом застосування лікувального плазмаферезу, гепарину та wobenzimu, а також місцеве лікування уражень шкіри за допомогою аплікацій поперемінно з розчинами гідрокарбонату натрію і оцтової кислоти. Ремісія наступила у 78% хворих.*

***Ключові слова:** Т-клітинні лімфони шкіри, субпопуляції лімфоцитів, плазмаферез, фотоферез.*

**RESULTS OF IMMUNOTHERAPY AND TOPICAL ANTISEPTIC
TREATMENT OF SKIN LESIONS IN MYCOSIS FUNGOIDES AND
CÉZARY SYNDROME**

**V. L. Novak, D. M. Kurhan, M. V. Kokoruz, J. V. Derkach, V. E. Loginsky, S.
V.Prymak, M. H. Kurhan**

SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine", Lviv

***Summary.** The treatment of 64 patients (54 patients are at different stages of mycosis fungoides and 10 with Cézary syndrome) is analyzed in this article. As an adjunction to the common cutaneous T-cell lymphoma therapy (photopheresis), an original treatment method, including detoxification and enhancement of protective immune responses by applying therapeutic plasmapheresis, heparin and wobenzym, was proposed. In addition, local treatment of skin lesions by applications alternately with solutions of sodium bicarbonate and acetic acid was proposed. After the treatment remission was reached in 78% of the patients.*

***Key words:** cutaneous T-cell lymphomas, subpopulation of lymphocytes, plasmapheresis, photopheresis.*

Вступ. Грибоподібний мікоз (ГМ; mycosis fungoides) і його лейкемічний варіант синдром Сезарі (СС; Cézary syndrome) представляють собою найчастіші

варіанти екстранодальних злоякісних Т-клітинних лімфом з ураженням шкіри малігнізованими зрілими CD4⁺ Т-лімфоцитами, які мають специфічний профіль експресії генів і дерматотропність яких зумовлена наявністю мембранного антигену CCR4 [1]. Антигени пухлинних Т-лімфоцитів взаємодіють з молекулами адгезії ендотелію шкірних венул, кератиноцитів і дендритних клітин шкіри, що сприяє їхньому нагромадженню в епідермісі і утворенню мікроабсцесів Потріє (Pautrier).

Частота ГМ і СС сягає 0,4 випадки на 100 000 населення; вони складають біля 3% серед усіх злоякісних лімфом [2]. Основні клінічні прояви ГМ – ураження шкіри у вигляді плям, бляшок, еритродермії, шкірних пухлин, виразок і ран, підвищена десквамація епітелію [3, 4, 5]. У пізніх стадіях хвороби та при СС з'являються ураження периферичних лімфатичних вузлів, внутрішніх органів (печінки, селезінки), явища лейкемізації з появою атипових клітин Сезарі в периферичній крові. Діагностика ґрунтується на гістологічному і імуногістохімічному дослідженні уражень шкіри з виявленням інфільтрації дерми атиповими Т-лімфоцитами з фенотипом CD3⁺CD7⁻CD4⁺CD8⁻CD30⁻ та моноклональністю TCR, зрідка трапляються випадки CD4⁻CD8⁺. Найбільші труднощі представляє діагностика еритродермічної форми ГМ [6]. Опрацьовано декілька міжнародних класифікацій типу уражень шкіри, клінічних форм, гістологічних варіантів і стадій поширення хвороби [3, 4, 7]. Прогноз на ранніх стадіях ГМ добрий, у 75% випадків хвороба має торпідний перебіг. У пізніх стадіях ГМ та при СС при залученні лімфатичних вузлів, вісцеральних органів, лейкемізації прогноз несприятливий – тривалість життя хворих не перевищує 2,5-3 роки [4, 7, 8].

В літературі обговорюється можлива роль інфекції і асоційованих імунних реакцій у підтримці проліферації пухлинних CD4⁺ Т-лімфоцитів [9, 10]. Автори вказують на колонізацію шкіри *Staphylococcus aureus* у хворих на ГМ і СС, наявність запальної клітинної реакції у місцях уражень, позитивний ефект антибактеріальної терапії, смерть хворих від інфекції без ознак прогресії

хвороби, проліферативну відповідь *in vitro* CD4⁺ Т-лімфоцитів хворих на стимуляцію суперантигеном ендотоксину *S. aureus* (SEA).

Мета дослідження. З'ясувати ефективність комплексу місцевого антисептичного лікування уражень шкіри, імуномодуляційної та протизапальної терапії у хворих на ГМ та СС, які отримували лікування екстракорпоральним фотоферезом (ЕФФ).

Хворі та методи дослідження. У відділенні екстракорпоральної гематології ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» з 2005 р. на лікуванні перебувало 64 хворих (54 пацієнти з ГМ і 10 – із СС) віком від 21 до 76 років, з них: 38 чоловіків і 26 жінок (співвідношення 1,5:1). Діагноз встановлювали на основі клінічних ознак хвороби, морфологічного дослідження біопсії шкіри з місць ураження, у частини хворих проведено імуногістохімічний аналіз лімфоїдних інфільтратів шкіри, цитологічного та імунофенотипового дослідження периферичної крові. За необхідності, для уточнення стадії хвороби виконували рентгенологічне і МРТ дослідження грудної клітки і черевної порожнини.

ЕФФ проводили за модифікованим методом Edelson [11]. За 2 год. до взяття крові хворий отримував *per os* 0,5-0,6 мг/кг маси тіла препарат 8-метоксипсоралену. Кров забирали з вени у пластикатні контейнери і центрифугували, еритроцитну масу повертали хворому, плазму утилізували, а лейкоцити (45-50 мл) доводили до 100 мл 0,9% розчином NaCl та опромінювали ультрафіолетом А (УФА), $\lambda=320-400$ нм лампою ЛУФ-8 (кількість енергії 0,45 Дж/мл лейкомаси) і повертали хворому.

Для лікування уражень шкіри всім хворим застосовували запропонований і опрацьований нами метод, який включає імунотерапію і місцеве антисептичне лікування [12]. Імуномодуляційне і протизапальне лікування складалося з лікувального плазмаферезу (ЛПФ), інфузій гепарину, курсів вобензиму. Хворим проводили 2-5 операцій ЛПФ з інтервалом в одну-дві доби. Зсідання

крові в екстракорпоральному контурі попереджували інфузією 200-250 ОД/кг маси тіла гепарину та змішуванням при взятті з консервантом у пластикатних контейнерах. За операцію ЛПФ видаляли 600-900 мл плазми. Видалену плазму заміщували 0,9% розчином NaCl та реосорбілактом з надлишком 100-150 мл. У випадку гіпопротеїнемії застосовували свіжозаморожену плазму. Вобензим призначали 0,25-0,30 табл./кг маси тіла на добу, курсами в 10 днів та перервами 14 днів. Кількість курсів вобензиму призначали залежно від тяжкості уражень.

Місцеве антисептичне лікування включало послідовну аплікацію на уражені ділянки шкіри розчину натрію гідрокарбонату в концентрації 0,05-0,2% та оцтової кислоти у концентрації 0,005-0,02% через день. При генералізованих ураженнях шкіри застосовували відповідні ванни. Для забезпечення комфортності пацієнта концентрацію розчинів у вказаних межах і їхню температуру встановлювали індивідуально. Кількість процедур призначали залежно від тяжкості уражень.

Під час лікування спостерігали за станом хворих, обсягом шкірних уражень і гемограмою. До та в кінці курсу запропонованої терапії проводили визначення популяцій лімфоцитів, концентрації імуноглобулінів, циркулюючих імуних комплексів (ЦІК), фактора некрозу пухлин (TNF), тканинного поліпептидного антигену (ТРА), активності печінкових ферментів. Результати цих досліджень опрацьовували методами описової статистики і порівнювали за допомогою t-критерію.

Результати та їх обговорення. За результатами клінічного та інструментального обстеження, морфологічного та імуногістохімічного дослідження біопсій шкіри, аналізу гемограми з імунофенотиповим визначенням популяцій лімфоцитів встановлювали стадію ГМ [4, 6]. До I стадії віднесли 23 хворих з еритемними плямами, лущенням епітелію, які уражали до 10% поверхні тіла, без залучення лімфовузлів та внутрішніх органів. II стадію ГМ діагностували у 19 хворих за наявності еритем та бляшок, які уражали більше ніж 10% поверхні тіла, поодиноких збільшених лімфовузлів та часом

невеликої кількості (5-10%) клітин Сезарі у периферичній крові. III стадію ГМ встановлено у 12 хворих із значним розповсюдженням уражень шкіри, появою шкірних пухлин, ерозій, виразок, залученням лімфатичних вузлів та внутрішніх органів (селезінки, печінки), наявністю у периферичній крові більше ніж 10% клітин Сезарі та збільшеної популяції CD4⁺ лімфоцитів. СС спостерігали у 10 хворих з генералізованою еритемою і інфільтрацією шкіри, вираженою десквамацією епітелію, ерозіями та ранами, вкритими гноєм, оніходистрофією та алопецією. У цих хворих виявляли генералізоване збільшення лімфатичних вузлів, гепатоспленомегалію, у периферичній крові – анемію, лімфоцитоз з 30-50% клітин Сезарі та перевагою CD4⁺ клітин.

Комплексне лікування за запропонованою схемою проведено 23 хворим з I стадією і 19 з II стадією ГМ. Воно приводило до зменшення глибини та обсягу шкірних уражень в середньому на 8-14% за 10 днів. У хворих з I стадією ГМ відсутні суттєві зміни гемограми до і після лікування. Результати імунологічних досліджень у хворих до лікування і після його завершення представлено у табл. 1. Відсоток лімфоцитів усіх визначених популяцій, включаючи CD4⁺ клітини, у хворих на I стадії ГМ не виходив за межі референтних значень, як до, так і після курсу терапії. Після лікування достовірно зріс відсоток лімфоцитів, CD3⁺ Т-клітин, CD19⁺ В-лімфоцитів та НК клітин у межах нормальних величин. Концентрація імуноглобулінів (G, A, M) після лікування знизилася, залишаючись у межах норми. Підвищений рівень IgE також знизився, значно перевищуючи нормальний показник. Вдвічі, до норми, зменшилася концентрація ЦК. Спостерігали також зниження концентрації TNF.

Таблиця 1 – Імунологічні показники у процесі лікування грибоподібного мікозу I і II стадій ($M \pm m$)

Показник	Норма	I стадія ГМ (n=20)		II стадія ГМ (n=16)	
		до лікув.	після лікув.	до лікув.	після лікув.
Лімфоцити і їхні популяції					

Лімфоцити (%)	18-40	22,4±1,3	30,6±2,2*	16,0±1,3	22,6±1,5*
Т-лімфоцити CD3 ⁺ (%)	67-76	69,2±0,1	70,3±0,2*	64,6±1,1	68,7±1,6
Т-гелпери CD4 ⁺ (%)	33-41	36,4±0,4	37,9±0,1*	30,2±2,1	34,3±0,5
Т-супресори/цитотоксичні клітини CD8 ⁺ (%)	27-35	29,2±0,3	31,4±0,9	26,4±1,6	34,4±2,1*
Співвідношення CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1-2	1,1±0,1	1,2±0,1	1,4±0,3	1,0±0,5
Цитотоксичні Т-клітини CD3 ⁺ CD16 ⁺ (%)	0-0,3	0,4±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1
В-лімфоцити CD19 ⁺ (%)	9-19	12,4±0,3	13,9±0,2*	5,3±0,4	10,7±1,3*
НК-клітини CD16 ⁺ /56 ⁺ (%)	7-17	12,3±0,3	13,8±0,4*	7,5±0,7	11,8±0,8*
Імуноглобуліни					
IgG (г/л)	7,0-16,0	9,353±0,246	7,471±0,365*	12,652±0,625	9,897±0,464*
IgA (г/л)	0,7-4,0	2,378±0,042	2,124±0,051*	2,843±0,043	2,537±0,052*
IgM (г/л)	0,4-2,3	1,891±0,192	1,230±0,134*	1,357±0,066	1,129±0,081,5
IgE (МО/мл)	<100	287,6±26,3	163,8±17,6*	389,4±30,7	232,4±25,7*
ЦІК (мг/мл)	30-90	107,3±12,1	57,8±6,1*	117,3±6,2	91,2±5,6*
Фактор некрозу пухлин, тканинний поліпептидний антиген					
TNF (пг/мл)	0,0-8,1	4,1±0,4	2,0±0,3*	9,7±0,6	7,6±0,5
ТРА (Од/л)	<75	52±10	60±11	43±20	61±10

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з показниками до лікування.

Лікування у II стадії ГМ привело до нормалізації кількості лейкоцитів (з $13,4 \pm 1,4 \times 10^9/\text{л}$ до $6,5 \pm 0,9 \times 10^9/\text{л}$); ШОЕ (з $16,0 \pm 2,3$ до $7,4 \pm 0,9$ мм/год). У цих хворих до комплексного лікування відсоток лімфоцитів, Т-клітин CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ і В-клітин CD19⁺ був меншим за значення фізіологічної норми, а після лікування зріс до нормальних величин. Збільшився відсоток НК-клітин. У кінці курсу лікування знижувався рівень імуноглобулінів G, A, E, ЦІК, TNF (табл. 1). Нормалізувалися підвищені показники печінкових ферментів АЛТ і АСТ.

В результаті проведеного лікування ремісія лімфоми наступила у 39 (93%) хворих I і II стадій ГМ. Рецидив виник у двох пацієнтів, їм для досягнення ремісії проводили повторні курси комплексної терапії. В одного хворого, незважаючи на лікування, хвороба набула прогресивного перебігу,

перейшла у III стадію ГМ, і він помер у межах часу спостереження. Решта хворих на цей час залишаються живими.

Комплексне лікування застосовано у 12 хворих з III стадією ГМ. Раніше в інших лікувальних закладах вони отримували різноманітне лікування (PUVA-терапію, кортикостероїдні препарати, хіміотерапію за схемами COP, CNOP, ACOP, CVP), яке призводило до короткочасної ремісії або стабілізації хвороби з подальшими тривалими рецидивами. Початковий стан хворих на ГМ у III стадії був тяжким і відповідав 3 ступеню за шкалою ECOG. Імунологічні показники у цих хворих до і після комплексного лікування представлено у табл. 2. Виявлено виражені зміни популяції лімфоцитів до лікування: суттєво вищий від значень норми відсоток CD3⁺T-лімфоцитів, цитотоксичних CD3⁺CD16⁺T-клітин, CD4⁺T-гелперів. Одночасно відсоток CD8⁺T-лімфоцитів знижений, що викликало високе співвідношення CD4⁺/CD8⁺ клітин (2,5±0,1). Відносна кількість В-лімфоцитів та NK-клітин знижена. Комплексне лікування не призвело до позитивних зрушень у популяціях лімфоцитів периферичної крові: зменшився відсоток лімфоцитів і популяції CD8⁺T-клітин при зростанні рівня CD3⁺T-лімфоцитів та популяції CD4⁺T-гелперів, тим самим співвідношення CD4⁺/CD8⁺ клітин зросло до 3,4±0,1. Відсоток CD19⁺B-лімфоцитів, NK-клітин під кінець терапії ще зменшувався. Рівень цитотоксичних T-лімфоцитів CD3⁺16⁺ під час лікування істотно зростав.

У пацієнтів з III стадією ГМ на початку лікування концентрація IgG, IgA, IgE була підвищеною (табл. 2). В результаті лікування нормалізувався рівень IgG і IgA, але не IgE. Залишалась високою і концентрація ЦК. Лікування не впливало на підвищений рівень TNF і пухлинного антигену TPA у хворих.

В результаті проведеного лікування ремісію досягнуто у 7 (58%) хворих з III стадією ГМ; у решті 5 випадках наступила смерть хворих внаслідок прогресування хвороби.

Таблиця 2 – Імунологічні показники у процесі лікування грибоподібного мікозу III стадії та синдрому Сезарі ($M \pm m$)

Показник	Норма	ІІІ стадія ГМ (n=6)		Синдром Сезарі (n=5)	
		до лікув.	після лікув.	до лікув.	після лікув.
Лімфоцити і їхні популяції					
Лімфоцити (%)	18-40	13,2±0,8	10,1±0,5*	39,5±0,2	41,6±0,6*
Т-лімфоцити CD3 ⁺ (%)	67-76	86,4±0,4	89,5±0,5*	94,6±0,3	96,7±0,4*
Т-гелпери CD4 ⁺ (%)	33-41	54,3±0,2	62,9±0,5*	83,3±0,2	88,3±0,7*
Т-супресори/цитотоксичні клітини CD8 ⁺ (%)	27-35	21,4±0,6	18,3±0,3*	7,8±0,3	6,6±0,2*
Співвідношення CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1-2	2,5±0,1	3,4±0,1*	10,7±0,2	13,4±0,2*
Цитотоксичні Т-клітини CD3 ⁺ CD16 ⁺ (%)	0-0,3	2,2±0,1	3,1±0,2*	0	0
В-лімфоцити CD19 ⁺ (%)	9-19	6,8±0,3	4,3±0,4*	2,8±0,2	2,1±0,3
НК-клітини CD16 ⁺ /56 ⁺ (%)	7-17	5,4±0,1	4,1±0,1*	2,3±0,1	1,2±0,1*
Імуноглобуліни					
Ig G (г/л)	7,0-16,0	18,213±0,987	11,746±0,994*	13,252±0,821	9,786±0,881
Ig A (г/л)	0,7-4,0	4,313±0,562	2,296±0,247*	2,175±0,231	1,305±0,147*
Ig M (г/л)	0,4-2,3	0,675±0,026	0,557±0,023	0,896±0,062	0,524±0,045*
Ig E (МО/мл)	<100	2018,1±8,6	1990,0±7,5	1181,3± 41,2	918,5±52,6*
ЦІК (мг/мл)	30-90	127,3±1,2	130,8±0,9	131,3±6,2	95,2±5,6*5
Фактор некрозу пухлин, тканинний поліпептидний антиген					
TNF (пг/мл)	0,0-8,1	15,9±0,3	17,5±0,6	8,6±0,7	11,7±0,3*
ТРА (Од/л)	<75	89,6±2,2	98,7±1,3*	78,3±2,2	89,4±3,1*

Примітка. * – p<0,05 порівняно з початковими показниками.

На лікуванні перебувало 10 хворих з діагнозом СС. Вони за місцем проживання отримували PUVA-терапію, кортикостероїдні препарати, поліхіміотерапію за схемами COP, CNOP, ACOP, CVP. Стан хворих на час звернення був тяжким і відповідав 3-4 ступеню за шкалою ECOG. У багатьох хворих на СС були прояви дегідратації, яка посилювала тяжкість їхнього стану. Як показано у табл. 2, до лікування у хворих на СС спостерігали значний лімфоцитоз за рахунок різко збільшеної популяції Т-лімфоцитів CD3⁺ і Т-гелперів CD4⁺; відсоток Т-супресорів/цитотоксичних клітин CD8⁺ знижений, що зумовило дуже високе співвідношення CD4⁺/CD8⁺ (10,7±0,2). Натомість відсоток В-лімфоцитів CD19⁺, НК-клітин був значно нижчим від значень

норми, а цитотоксичні Т-клітини CD3⁺CD16⁺ взагалі відсутні. Концентрація IgG, А, М у межах нормальних величин, IgE та ЦІК – підвищена.

Комплексне лікування призводило (у 5 хворих на СС з негативним його результатом) до вірогідного зростання лімфоцитозу та поглиблення розладів у популяціях лімфоцитів. Збільшувався відсоток Т-лімфоцитів CD3⁺ і Т-гелперів CD4⁺, знижувався відсоток Т-супресорів/цитотоксичних клітин CD8⁺, а співвідношення CD4⁺/CD8⁺ стало 13,4±0,2 (p<0,05). Після лікування відсоток Т-супресорів/цитотоксичних клітин CD8⁺ і NK-клітин зменшувався. Знижувалася (у межах нормальних величин) концентрація IgG, А, М. Вміст TNF та ТРА зростав.

Комплексне лікування зумовило ремісію у 3 (30%) з 10 хворих на СС. Один пацієнт помер від хронічної обструктивної хвороби легень, а шестеро, стан яких був дуже тяжкий, померли в різні терміни під час лікування.

Стандарти лікування ГМ і СС не розроблено, і різні центри у США і Європі пропонують свої лікувальні схеми залежно від форми і стадії лімфоми, жодна з яких не має доведених переваг [1, 6, 13, 14]. Стратегію лікування ГМ і СС визначає інтенсивність клінічних симптомів. Вона обов'язково включає фотодинамічну терапію (опромінення ультрафіолетом В, PUVA-терапію, екстракорпоральний фотоферез) або тотальне опромінення шкіри пучком електронів, а також місцеве або пероральне застосування ретиноїдів, кортикостероїдів, хіміопрепаратів, інтерферону α. Постійно апробуються нові препарати для лікування Т-клітинних лімфом шкіри (ТКЛШ) на основі інгібіторів гістонової деацетилази (ворінонат, ромідепсин) та моноклональних антитіл (анти-CCR4 – могамулізумаб) [15]. Позитивним результатом лікування вважають зменшення уражень шкіри на 25% і відсутність прогресії хвороби при підтримувальній терапії [4, 6, 13]. Лікування кортикостероїдами та цитостатичними препаратами дає покращення на 3-25 міс. і може ускладнитися пригніченням гемопоезу, ураженням печінки [6, 13]. Застосування

екстракорпорального фотоферезу (ЕФФ) у хворих на ГМ I-II стадій призводить до ремісії тривалістю до 3 років [1, 6, 16].

На основі повідомлень літератури про роль імунних реакцій, спричинених бактеріальними збудниками з вогнищ ураження, у патогенезі ГМ і СС та підтриманні проліферації зрілих дерматотропних CD4⁺ Т-лімфоцитів злоякісного клону [9, 10] нами розроблено метод комплексного лікування цих хворих, який включає імуномодуляційну терапію та місцеве антисептичне лікування уражень шкіри [12]. Лікування розпочинали з детоксикації хворих шляхом проведення 2-5 операцій ЛПФ з інтервалом в одну-дві доби. Гепарин застосовували для запобігання зсіданню крові при ЛПФ, утворенню ЦК, активації процесів очищення – фагоцитозу. Обґрунтуванням застосування курсів вобензиму були його протизапальна дія, зменшення проявів автоімунних та імунокомплексних реакцій, поліпшення мікроциркуляції. Для подолання бактеріальної інфекції шкіри деякі автори рекомендують антибіотикотерапію, що однак не здобуло загального визнання [6, 13]. Для уникнення побічної дії антибіотиків ми застосували простий метод антисептичного лікування – послідовні аплікації або ванни з натрію гідрокарбонату, який сприяв очищенню та загоєнню ран, ерозій, нормалізації показників рН, та розчину оцтової кислоти з антисептичною і в'язучою дією шляхом ацетилювання.

Результати опрацьованого нами лікування хворих на ГМ і СС, спрямованого на пригнічення супутньої інфекції та викликаних нею та пухлиною імунних і імунокомплексних процесів, залежали від стадії пухлинного процесу. У пацієнтів з I-II стадіями ГМ після лікування у 93% хворих виникала тривала ремісія (термін спостереження 9 років), яка характеризувалася зникненням уражень шкіри, нормалізацією імунологічних показників (популяцій лімфоцитів, концентрації імуноглобулінів, зниженням рівня ЦК), поліпшенням якості життя хворих. На III стадії ГМ ефективність лікування була нижчою, тільки у 58% пацієнтів наступила ремісія. У хворих на СС з генералізованим пухлинним процесом і наявністю злоякісних CD4⁺ Т-

лімфоцитів у периферичній крові ремісію вдалося досягнути тільки у 30% випадків.

Висновки

1. Запропоновано оригінальний метод лікування хворих на грибоподібний мікоз і синдром Сезарі, спрямований на пригнічення супутньої інфекції та викликаних нею та пухлиною імунних і імунокомплексних процесів, як доповнення до екстракорпорального фотоферезу.

2. Опрацьований метод включає детоксикацію і посилення захисних імунних реакцій шляхом застосування лікувального плазмаферезу, гепарину та вобензиму, а також місцеве лікування уражень шкіри за допомогою аплікацій (ванн) поперемінно з розчинами гідрокарбонату натрію і оцтової кислоти.

3. Застосування такої терапії приводить у хворих на грибоподібний мікоз і синдром Сезарі до поступового зникнення уражень шкіри, нормалізації імунологічних показників, поліпшення якості життя.

4. Віддалені результати лікування залежать від стадії пухлинного процесу. У пацієнтів з I-II стадіями грибоподібного мікозу після лікування у 93% хворих виникала тривала ремісія. На III стадії хвороби ремісія наступила тільки у 58% пацієнтів. У хворих на синдром Сезарі ремісію вдалося досягнути у 30% випадків.

Література

1. Management of cutaneous T cell lymphoma: new and emerging targets and treatment options / J.Y. Li, S. Horwitz, A. Moskowitz, [et al.] // *Cancer Manag. Res.* – 2012. – V. 4, No 3. – P. 75–89.

2. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases / P.T. Bradford, S.S. Devesa, W.F. Anderson, J.R. Toro // *Blood.* – 2009. – V. 113, No 21. – P. 5064-5073.

3. Zinzani P.L. Mycosis fungoides // P.L. Zinzani, A.J.M. Ferreri, L. Cerroni // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2008. – V. 65. – P. 172–182.

4. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: A consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization for Research and Treatment of Cancer / E.A. Olsen, S. Whittaker, Y.H. Kim, [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – V. 29, No 18. – P. 2598-2607.

5. Wilcox R.A. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management / R.A. Wilcox // *Am. J. Hematol.* – 2016. – V. 91, No 1. – P. 151–165.

6. Whittaker S. How I treat mycosis fungoides and Sézary syndrome / S. Whittaker, R. Hoppe, H.M. Prince // *Blood.* – 2016 – V. 127, No 25. – P. 3142-3153.

7. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: Validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal / N.S. Agar, E. Wedgeworth, S. Crichton, [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – V. 28, No 31. – P. 4730-4739.

8. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression / Y.H. Kim, H.L. Liu, S. Mraz-Gernhard, [et al.] // *Arch. Dermatol.* – 2003. – V. 139, No 7. – P. 857-866.

9. Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive *Staphylococcus aureus*, and oligoclonal T-cell receptor $V\beta$ gene expansion / C.M. Jackow, J.C. Cather, V. Hearne, [et al.] // *Blood.* – 1997. – V. 89, No 1. – P. 32-40.

10. Staphylococcal enterotoxin A (SEA) stimulates STAT3 activation and IL-17 expression in cutaneous T-cell lymphoma // A. Willerslev-Olsen, T. Krejsgaard, L.M. Lindahl, [et al.] // *Blood.* – 2016. – V. 127, No 10. – P. 1287-1296.

11. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis / R. Knobler, G. Berlin, P. Calzavara-Pinton, [et al.] / J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2014. – V. 28, Suppl. 1. – P. 1–37.

12. Патент 104878 Україна (UA), МПК А61К 31/37 (2006.01), А61К 31/4745 (2006.01), А61К 38/13 (2006.01), А61К 31/727 (2006.01), А61К 37/04 (2006.01). Спосіб лікування Т-клітинних лімфом шкіри / Курган Д.М., Курган М.Г., Кокоруз М.В. [та ін.]; № u201107382; Заявл. 14.06.2011; Опубл. 25.03.2014; Бюл. № 6.

13. EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome / F. Trautinger, R. Knobler, R. Willemze, [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2006. – V. 42, No 8. – P. 1014–1030.

14. Topical Chemotherapy in Cutaneous T-cell Lymphoma: positive results of a randomized, controlled, multicenter trial testing the efficacy and safety of a novel mechlorethamine, 0.02%, gel in mycosis fungoides / S.R. Lessin, M. Duvic, J. Guitart, [et al.] // JAMA Dermatol. – 2013. – V. 149, No 1. – P. 25-32.

15. Jain S. Novel therapeutic agents for cutaneous T-cell lymphoma / S. Jain, J. Zain, O. O'Connor // J. Hematol. Oncol. – 2012. – V. 5, No 1. – P. 24-39.

16. High clinical response rate with multimodality immunomodulatory therapy for Sézary syndrome / S.K. Richardson, J.H. Lin, C.C.Vittorio, [et al.] // Clin. Lymph. Myel. – 2006. – V. 7, No 3. – P. 226-232.

Надійшла 08.11.2017 року.

УДК 616-001.18:616-002.1

ДИНАМІКА ЗМІН ПРО- ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ПОСТТРАВМАТИЧНИХ З ХОЛОДОВОЮ ТРАВМОЮ

О. І. Осадча¹, Г.П. Хитрий²

¹ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України", Київ

² Українська військово-медична академія, Київ

***Резюме.** Обстежено 35 хворих з переохолодженням і відмороженнями кінцівок II-IV ступеню. Визначено динаміку змін про- і протизапальних цитокінів в периферичній крові потерпілих з холодовою травмою в реактивному періоді хвороби. Були проведені*

дослідження вмісту медіаторів запальної реакції: інтерлейкінів (ІЛ) – 1, 2, 4, 6 і чинника некрозу пухлин (ЧНП- α). У потерпілих з холодовою травмою визначено значне підвищення вмісту прозапальних цитокінів в усі терміни дослідження. При цьому встановлено, що найбільш значним було підвищення вмісту ЧНП- α , ІЛ-6 і ІЛ-1. Дані тенденції свідчать про формування неадекватної запальної відповіді у даної категорії хворих.

Ключові слова: медіатори запалення, холодова травма, системна запальна відповідь.

DYNAMICS OF CHANGES IN PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN VICTIMS AFFECTED WITH COLD INJURY

O. I. Osadcha¹, G. P. Khytryy²

¹ SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

² Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv

Summary. We examined 35 patients with hypothermia and frostbite of limbs II-IV degree. Determined the dynamics of changes in pro-and anti-inflammatory cytokines in the peripheral blood of victims with cold trauma during the reactionary period of the disease. Studies have been conducted on the content of the mediators of inflammatory response: interleukins (IL) - 1, 2, 4, 6 and tumor necrosis factor (TNF- α). Patients with cold injury demonstrated the significant increase in cytokines serum level at all stages of investigation. The TNF- α , IL-6 and IL-1 level increased maximally. This tendency is the evidence of unequal inflammatory response in this category of patients.

Key words: inflammatory mediators, cold injury, systemic inflammatory response.

Вступ. При холодовій травмі імунні реакції організму розрізняються не тільки від виду охолодження, але й залежать від того, коли відбувалося це охолодження. Імунна та терморегуляторна системи, очевидно, знаходяться в тісному і складному взаємозв'язку. Дія холоду на терморецептори шкіри запускає сигнал, який змінює активність специфічних ділянок мозку. Далі вже сигнали самого мозку змінюють роботу ендокринних систем організму, що відповідають за імунну відповідь [6, 7].

У перебігу патологічного процесу виділяють фази компенсації і декомпенсації терморегуляції організму. У фазі компенсації зберігається нормальна температура тіла внаслідок посилення теплоутворення і зниження тепловіддачі. В міру виснаження енергетичних запасів поступово знижується температура тіла, а разом з тим згасають основні функції організму. Патологічний процес переходить у фазу декомпенсації системи терморегуляції. Зниження температури тіла нижче 25—32°C призводить до летального наслідку [6, 7].

Холодова травма також супроводжується розвитком ендогенної інтоксикації, яка пов'язана з накопиченням в організмі потерпілого токсинів мікробного і тканинного походження [3]. Масивне антигенне навантаження призводить до підвищення продукції макрофагами прозапальних медіаторів – інтерлейкінів (ІЛ): ІЛ-1, ІЛ-6, а також чинника некрозу пухлини- α (ЧНП- α). Дані процеси обумовлюють розвиток синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ) або SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) [4].

Як при розвитку відморожень – місцевій холодовій травмі, так і при загальній холодовій травмі – переохолодженні, клінічний перебіг холодкових уражень складається з біологічно доцільних процесів, що закономірно змінюють один одного і визначають періоди холодової хвороби [5, 6, 7]. Проте, до теперішнього часу не встановлені особливості динаміки вмісту про- і протизапальних медіаторів у крові хворих з переохолодженням і відмороженнями. Відповідь на це питання дозволить уточнити патогенез уражень організму потерпілих низькими температурами і особливості перебігу запалення при холодовій травмі.

Мета роботи: визначення динаміки змін про- і протизапальних цитокінів у периферичній крові потерпілих з холодовою травмою в реактивному періоді хвороби.

Матеріали і методи. У 35 хворих з переохолодженням і відмороженнями кінцівок II-IV ступеня, у віці від 20 до 65 років, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в Київському центрі термічної травми та пластичної хірургії, були проведені дослідження вмісту медіаторів запальної реакції: інтерлейкінів (ІЛ) – 1, 2, 4, 6 і ЧНП- α [1]. З переохолодженням було досліджено 12 хворих, з відмороженнями – 23 хворих. З дослідження виключалися хворі, які мали тяжку соматичну патологію (ішемічна хвороба серця, гіпертонічна хвороба, цукровий діабет), а також хворі, в яких перебіг холодової травми ускладнювався запальними процесами іншої локалізації. Дослідження проведені на 3-4 і 9-11 добу реактивного періоду холодової хвороби.

Результати та їх обговорення. Дослідження цитокінового статусу показало, що на 3-4 добу після холодової травми спостерігається значне підвищення концентрації прозапальних інтерлейкінів: ІЛ-1, ІЛ-6 та ЧНП- α по відношенню до показників здорових осіб ($p < 0,01$). Так, вміст ІЛ-1 був більшим на 86,9% або в 7,7 рази, ІЛ-6 – відповідно на 91,9% або в 12,4 рази, ЧНП- α – на 97,7% або в 44 рази. Вміст протизапальних цитокінів – ІЛ-2 та ІЛ-4 також був підвищеним ($p < 0,01$) (табл. 1). Вміст ІЛ-2 був більшим на 76,5% або в 4,3 рази, ІЛ-4 – відповідно на 69,0% або в 3,2 рази, що є свідченням вираженої запальної реакції у хворих цієї категорії.

Таблиця 1 – Вміст про- та протизапальних медіаторів при холодовій травмі, $M \pm m$, $n = 35$

Досліджувані показники	Одиниці виміру	Доба після травми		Показники здорових осіб ($n=10$)
		3-4	9-11	
ІЛ-1	Пг/мл	199,0 \pm 27,0 *	192,5 \pm 21,1*	26,0 \pm 8,1
ІЛ-2	Пг/мл	54,35 \pm 10,50 *	65,31 \pm 8,45 *	12,75 \pm 1,25
ІЛ-4	Пг/мл	105,5 \pm 27,3 *	79,5 \pm 5,0 *	32,7 \pm 7,5
ІЛ-6	Пг/мл	531,0 \pm 112,0 *	85,30 \pm 13,10 *, **	42,7 \pm 8,5
ЧНП- α	Пг/мл	1065,2 \pm 146,7 *	345,0 \pm 15,5 *, **	24,2 \pm 6,0

Примітки: * – вірогідно порівняно з показниками у здорових осіб ($p < 0,01$);

** – вірогідно порівняно з показниками у потерпілих на 3-4 добу ($p < 0,01$).

На 9-11 добу після травми встановлена тенденція до зниження показників прозапальних інтерлейкінів по відношенню до вихідних значень. Так, зменшення ІЛ-1 було на 3,2% ($p > 0,05$), ІЛ-6 – на 83,9% або в 6,2 рази менше ($p < 0,01$), ЧНП- α – на 67,6% або в 3,1 рази менше ($p < 0,01$). Проте, зберігалось достовірне підвищення цих показників по відношенню до показників здорових осіб ($p < 0,01$). Вміст ІЛ-1 був більшим на 13,5% або в 7,4 рази, ІЛ-6 – відповідно на 49,9% або в 2 рази, ЧНП- α – на 93% або в 14,3 рази менше. Концентрація протизапального цитокіну ІЛ-2 дещо підвищувалась (на 16,8%, $p > 0,05$), а ІЛ-4 – знижувалась (на 24,6%, $p > 0,05$) по відношенню до вихідних значень. Однак, ці показники значно перевищували значення у здорових осіб ($p < 0,01$). Отримані дані свідчать про розбалансування і пригнічення імунної

відповіді та неефективний синтез прозапального інтерлейкіну ІЛ-1, що є однією з ознак розвитку системної запальної відповіді у хворих з холодовою травмою.

У початковій стадії розвитку запалення одночасно виділяються як прозапальні, так і протизапальні інтерлейкіни. Ушкоджувальна дія прозапальних інтерлейкінів у значній мірі нейтралізується протизапальними, завдяки чому досягаються їх баланс і зменшення тяжкості запалення. Протизапальні цитокіни мають корисну дію, вони сприяють обмеженню запалення, зменшенню загальної реакції на запалення, загоєнню рани [2]. Відомо також, що при запаленні спочатку послідовно секретуються такі цитокіни, як ЧНП- α , інтерлейкін-1 і ІЛ-6 [8]. Потім ІЛ-6 починає пригнічувати секрецію ЧНП- α і інтерлейкіна-1 [9], активувати продукцію печінкою білків гострої фази запалення і стимулювати гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову систему [7], що сприяє регуляції запального процесу. У цьому сенсі, ІЛ-6 можна розглядати і як прозапальний, і як протизапальний цитокін.

В нашому дослідженні було встановлено, що у потерпілих з холодовою травмою відмічається підвищення вмісту як про-, так і протизапальних цитокінів в усі терміни дослідження, при цьому найбільш значущими показниками відрізнявся вміст ЧНП- α , ІЛ-6 і ІЛ-1. Наші дані узгоджуються з проведеними дослідженнями інших авторів, які вивчали подібну проблему. Так, згідно К. Г. Шаповалова і співавт. [5], в ранньому реактивному періоді місцевої холодової травми у хворих в крові максимально зростає вміст ЧНП- α , ІЛ-1, ІЛ-4, ІЛ-8 і ІЛ-18, а в подальші періоди – знижується. При цьому концентрація ІЛ-1 перевищувала контрольні значення в усі періоди холодової травми.

Відомо, що ІЛ-1, який виробляють моноцити і макрофаги, запускає багато реакцій, названих разом «гострою фазою реакції відповіді». Так, наприклад, ІЛ-1 активує Т- і В-лімфоцити, стимулює утворення С-реактивних білків ранньої фази запалення, продукцію прозапальних медіаторів (ІЛ-6, ІЛ-8, ЧНП) і чинника активації тромбоцитів. Він збільшує прокоагулянтну активність ендотелію і активність адгезивних молекул на поверхні клітин ендотелію,

лейкоцитів і тромбоцитів, призводить до утворення мікротромбів в судинах мікроциркуляторного русла, викликає підвищення температури тіла [2].

Коли ІЛ-1 взаємодіє з термочутливими нейронами преоптичної ділянки гіпоталамуса, відбувається різке підвищення теплопродукції в м'язах (озноб), що супроводжується зниженням тепловіддачі (звуження судин шкіри, «гусяча шкіра» або «мороз по шкірі»). Температура серединних структур організму підвищується до тих пір, поки не досягне стабільної верхньої межі, і не встановиться рівновага між теплопродукцією і тепловіддачею. Температура крові, що омиває гіпоталамус, стає рівною новому встановленому рівню.

Вважається, що в гіпоталамусі ІЛ-1 стимулює синтез простагландинів типу Є, використовуючи при цьому арахідонову кислоту, що вивільняється з мембран клітин-мішеней. Зокрема, простагландин Є1 (ПгЄ1) активує механізми теплопродукції і тепловіддачі шляхом посилення синтезу циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ).

Отримані результати свідчать, що у потерпілих з холодовою травмою значне підвищення ІЛ-1 в ранньому реактивному періоді, на нашу думку, пов'язане з активацією систем адаптації до переохолодження і є захисною реакцією організму. У той же час, підвищений вміст ІЛ-1 в пізніші терміни свідчить про розвиток запальної реакції. При цьому, дані процеси протікають на тлі значного підвищення цитокінів як про-, так і протизапальної дії, що свідчить про неефективну інгібіцію синтезу прозапального ІЛ-1.

На нашу думку, відсутність ефективного інгібуючого впливу ІЛ-4 на продукцію прозапальних медіаторів сприяло розвитку цитокінових взаємодій, направлених на формування запальної реакції за гіперреактивним типом. З одного боку, ІЛ-1 підтримував високу концентрацію ЧНП, який стимулював синтез ІЛ-6, що, в свою чергу, не обмежувало синтез ІЛ-1. З іншого боку, підвищення щодо контрольних величин концентрації ІЛ-4, сприяло розвитку імуносупресії у даної групи хворих.

Надлишкова продукція цитокінів і інших медіаторів запалення викликає

порушення регулюючої функції імунної системи, призводить до їх неконтрольованого виділення, порушення балансу між прозапальними і протизапальними цитокінами на користь прозапальних. У зв'язку з цим, медіатори запалення з чинників, що захищають організм, стають ушкоджуючими для нього.

Таким чином, розбалансованість цитокінової регуляції при холодових ураженнях є причиною розвитку дисфункцій в системі імунної відповіді, що призводить до розвитку ССЗВ і поліорганної недостатності.

Висновки.

1. У потерпілих з холодовою травмою відмічається підвищення вмісту як про- так і протизапальних цитокінів в усі терміни дослідження, при цьому найбільш значущими показниками відрізнявся вміст ЧНП- α , ІЛ-6 і ІЛ-1.

2. У потерпілих з холодовою травмою має місце розбалансованість цитокінової регуляції, що призводить до розвитку ССЗВ і поліорганної недостатності.

Література

1. Бацков С. С. Основы клинической иммунологии (руководство для врачей). // Бацков С. С., Лапаев И. Б., Цыган В. Н. – СПб, 2003. – 121 с.

2. Возианов А. Ф. Цитокины. Биологические и противовоспалительные свойства. // Возианов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П. – К.: Наук. думка, 1998. – 317 с.

3. Котельников В. П. Отморожения./ В. П. Котельников – М.: Медицина, 1988. – 256 с.

4. Новикова Р. И. Синдром системного воспалительного ответа с позиции теории общеадаптационных реакций / Новикова Р. И., Черный В. И., Кузнецова И. В. [и др.] // Біль, знеболювання та інтенсивна терапія. – 2000. – №1(д). – С.73-75.

5. Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме / Шаповалов К. Г., Томина Е. А., Михайличенко М. И [и др.] // Медицинская иммунология. – 2008. – Т.10, №1. – С. 89-92.

6. Холодовая травма / Хапкин А. В., Карасева Ю. В., Киреева С. С. [и др.] // Весник новых медицинских технологий. Электронный журнал. – 2017. – №1. – С. 153-161

7. Чадаев А.П. Холодовая травма / Чадаев А.П., Свиридов С.В., Климиашвили А.Д. // Российский медицинский журнал. – 2005. – №5. – С. 20-23.

8. Interleukin-6 and the acute phase response. / Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. // Biochem J. – 1990. – № 265. – С. 621-636.

9. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. / Schindler R., Mancilla J., Endres S. [et al] // Blood. – 1990. – № 75. – 40-47.

Надійшла 20.10.2017 року.

УДК 612.118.221.2:615.385

ЯКІСНЕ ОБСТЕЖЕННЯ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ – ЗАПОРУКА БЕЗПЕЧНОСТІ ТРАНСФУЗІЙНОЇ ТЕРАПІЇ

Р. П. Павлюк, Г. А. Мироненко, У. В. Тимошенко

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

***Резюме.** Постійне поглиблення теоретичних знань та покращення практичних навичок є нагальним для персоналу імуногематологічних лабораторій служби крові. Акцентовано увагу на актуальних практичних питаннях: ідентифікації слабких та варіантних форм антигенів А та D, принципах виявлення алоімуних антитіл у донорів. Описано необхідність впровадження в рутинну практику лабораторій служби крові непрямой проби Кумбса та розширення палітри досліджуваних еритроцитарних антигенів у донорів.*

***Ключові слова:** антигени еритроцитів, антиеритроцитарні антитіла, імунологічна безпека.*

**HIGH-QUALITY EXAMINATION OF DONOR BLOOD IS A
GUARANTEE OF SAFETY OF TRANSFUSION THERAPY**

R. P. Pavlyuk, H. A. Myronenko, U. V. Tymoshenko

SI “Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine”, Kiev

Summary. Constant deepening of theoretical knowledge and improvement of practical skills is necessary for the staff of immunohematological blood service laboratories. Attention was pay to actual practical issues: identification of weak and variant forms of antigens A and D, principles of detection of aloimmune antibodies from donors. The necessity of introducing into the routine practice of Blood Laboratories of the indirect sample of Coumbs and expanding the palette of investigated erythrocytic antigens from donors was describe in this article.

Key words: erythrocyte antigens, anti erythrocyte antibodies, immunological safety.

Трансфузійна терапія займає чільне місце в лікуванні багатьох хвороб та патологічних станів. Ефективність її проведення безпосередньо залежить від якості заготовлених та виготовлених продуктів крові. Зрозуміло, що без відповідного обстеження донорської крові не можуть бути отримані якісні компоненти крові або препарати. Тому інфекційна та імунологічна безпека, насамперед, стосуються донорської крові. Тобто, якісне обстеження крові донорів – запорука якості компонентів та препаратів крові і безпечності трансфузійної терапії.

Імунологічне обстеження донорської крові, на сьогоднішній день, не може обмежуватись визначенням її групової та резус-належності. Воно має включати встановлення ширшого спектру еритроцитарних антигенів систем АВ0, Резус та інших, з обов'язковим дослідженням як раптових, так і природних антитіл.

Обстеження крові донорів дещо відрізняється від обстеження крові реципієнтів. І це пов'язано з тим, що в разі виникнення проблем або помилок при виявленні антигенів еритроцитів А, В або D у реципієнта, його кров може буде віднесена до 0(I) групи і резус-негативного типу. І при необхідності застосування трансфузії еритроцитів йому будуть призначені еритроцити донора 0(I), rh-. Але, якщо подібне станеться з донорською кров'ю, то наслідки будуть фатальні. Тому хотілось би ще раз нагадати про необхідність ретельного обстеження донорської крові і зупинитись на особливостях її тестування.

Звичайно, визначення групи крові АВ0 проводиться у перехресній пробі, тобто з обов'язковим визначенням антигенів А і В на еритроцитах і природних анти-А і анти-В антитіл у сироватці крові.

Антигени можуть визначатись за допомогою МКА на площині, в пробірках, в планшетах, в гелевому середовищі. Головне застосовувати такі реагенти, якість яких дозволяє виявити антигени А і В та їх слабкі варіанти.

Серед європейців 80% індивідів, що належать до групи крові А, мають підгрупу А₁, інші 20% належать до підгрупи А₂. Існує ще кілька підгруп антигену А: А_m, А_x, А_{end}, А_{del} [2,3].

Для диференційної діагностики А₂ і А₁ існують цоліклони анти-А₁ і анти-А₂: еритроцити А₂ і А₂В не дають реакції з анти-А₁ і чітко реагують з анти-А₂. Цоліклони анти-А_{сл} дозволяють виявити і інші слабкі варіанти антигену А. Після змішування реагенту анти-А_{сл} і досліджуваних еритроцитів в перші 10 секунд настає аглютинація з антигенами А₁ і А₂, а при подовженні часу спостереження до 5 хвилин, як зазначено в інструкції, аглютинація, що виникає, обумовлена іншими слабкими формами антигену А: А_x, А_m або іншими. В таблиці показані реакції, які характеризують МКА виробництва ООО «Гематолог».

Таблиця – Специфічність МКА по відношенню до антигенів А

Цоліклони	Сила аглютинації із варіантами антигену А			
	А ₁	А ₂	А ₃	А _x
Анти-А	++++	++++	++/++++	++/+ -
Анти-А ₁	++++	-	-	-
Анти-А _{сл}	++++	++++	++/++++	++/+

Примітка: (++++) – сильна аглютинація; (++/++++) – варіабельна аглютинація; (++/+) – слабка аглютинація; (-) – негативна аглютинація.

Слабкі варіанти антигену В притаманні монголоїдним популяціям і в нашій популяції зустрічаються рідко [1].

Для визначення анти-А і анти-В антитіл у сироватці крові донорів застосовують стандартні еритроцити 0, А (A₁), В, які виготовляють центри крові або фірми, такі як BioRad для гелевого тесту. І тут слід запам'ятати, що не можна використовувати випадково взяті зразки еритроцитів в якості стандартних еритроцитів 0, А, В.

Для виготовлення стандартних еритроцитів залучаються спеціально відібрані зразки еритроцитів, не тільки з відповідно встановленою групою крові, але й більш активніші, з хорошою авідністю, які вступають в реакцію аглютинації вже на перших секундах дослідження. В іншому випадку, еритроцити, що застосовані для перехресної проби, можуть не виявити антитіла при низькій концентрації та/або слабкій авідності анти-А і анти-В антитіл.

У деяких випадках інструкція не забороняє використовувати «універсальну» донорську кров реципієнту без урахування його групової належності. Вважається, що анти-А і анти-В антитіла донора «розчиняться» (розведуться) у крові реципієнта і не вступають в реакцію з А чи В антигеном. Щоб не допустити реакції зворотної аглютинації, слід пам'ятати кілька умов (обставин), що кількість універсальної крові, яка планується для переливання, повинна бути обмежена, також треба враховувати ступінь знекровлення реципієнта і знати титр природних антитіл у крові донора. Донорська кров з високим титром анти-А та анти-В антитіл небезпечна для трансфузії.

Таким чином, обстеження донорської крові за антигенами системи АВ0 передбачає: визначення групи крові за антигенами еритроцитів і за антитілами сироватки з застосуванням реагентів, що виявляють не тільки нормальний антиген А (В), а і його слабкі форми, вилучення зразків крові з високими титрами анти-А і анти-В антитіл для виготовлення імунологічних стандартів. Донорська кров або еритроцити з проблемними групами не може видаватись для трансфузії і має утилізуватись.

Для визначення антигену D системи резус існують декілька реагентів різних фірм, які дозволяють якісно, безпомилково визначити, як правило, нормальний D на еритроцитах донора. Але існують слабкоаглютинабельні форми антигену D: D_{weak} (слабкий), що характеризується меншою кількістю антигенних детермінант на мембрані еритроцита, і D_{partial} (частковий), у якого є змінений антиген D з відсутніми одним або декількома епітопами. Ці форми антигену D мають імуногенні властивості, і, якщо їх не виявити на еритроцитах донора і позначити такий зразок як резус-негативний, то при переливанні його резус-негативному реципієнту, останній буде сенсibilізований і в нього можуть виникнути анти-D антитіла. За нашими даними (2011 р.), частота слабкоаглютинабельних форм антигену D в Україні складає 0,8%, тобто майже кожен сотий донор при недосконалому обстеженні може бути потенційно небезпечним [4].

Тому правильне встановлення резус-належності донорської крові дуже важливе і проводиться у два етапи. На першому етапі використовують метод прямої аглютинації на площині, в пробірках, мікроплатах із застосуванням стандартних сироваток, МКА анти-D (Ig M) або гелевий тест. На другому етапі всі зразки крові донорів, які дали негативний результат, додатково досліджують за допомоги реагенту анти-D (IgG) у непрямому антиглобуліновому тесті (НАТ), гелевому тесті або желатиновим методом – це дозволяє виявити категорії антигену D (включаючи високоімуногенний D^{VI}).

Широкого застосування в Україні набули реагенти типу Blend (мікс), представлені сумішшю моноклональних антитіл класів IgM та IgG. Це має певні переваги, сприяє зручності діагностики та оптимізації процесу ідентифікації слабкоаглютинабельних форм антигену D.

Тестування за допомогою реагентів такого типу відбувається в два етапи – на першому (реакція прямої аглютинації) антиген D визначається за допомогою IgM антитіл (в цій реакції можливе визначення деяких його слабких та варіантних форм, включаючи D^{VI}). За відсутності реакції слід переходити до

другого етапу, де антитілами класу IgG в непрямому антиглобуліновому тесті (пробі Кумбса) виявляється більш широкий спектр слабких та варіантних форм антигену D.

Є неправильним обмежити обстеження донора реагентами типу мікс тільки першим етапом – можливе невиявлення деяких категорій антигену D та помилкова ідентифікація донора, як резус-негативного. Слід відмітити, що при використанні таких реагентів тільки в реакції прямої аглютинації може мати місце псевдонегативна реакція через те, що IgG антитіла в їх складі здатні конкурентно зв'язуватися із епітопами D антигену, особливо якщо вони представлені в невеликій кількості на поверхні еритроцита, і ці епітопи стають недоступними для моноклональних IgM антитіл. Як результат – зменшення сили аглютинації або повна її інгібіція. У зв'язку з цим, можливе помилкове визначення резус-належності як негативної у резус-позитивних осіб [11].

Таким чином, завданням служби крові є ідентифікувати максимальне число можливих слабких та варіантних форм антигену D для унеможливлення імунізації потенційного реципієнта. Якщо найменування клону антитіл та спектр категорій антигену D, які вони дозволяють виявити, вказуються виробником, це дає змогу споживачу раціонально підбирати реагент згідно своїх потреб. Впровадження методики Кумбса для обстеження донорів є найоптимальнішим способом ідентифікації слабкоаглютинабельних форм антигену D, проте потребує спеціально підготовленого персоналу та значних трат часу. Використання гелевої методики значно спрощує процедуру проведення реакції і потребує мінімальних затрат часу.

Кров D-негативних донорів додатково досліджується на наявність антигенів C та E за допомоги МКА анти-C і анти-E або стандартних сироваток анти-C і анти-E. Більшість резус-негативних осіб має фенотип dce, проте 2-5 % осіб, що не несуть на еритроцитах антигену D і резус-негативних за визначенням, мають фенотип dCe і dcE [1].

Отже, до числа резус-негативних донорів відносять тільки тих осіб, фенотип еритроцитів яких не містить ні одного із перелічених антигенів: D (включаючи D_{weak} та D_{partial}), C або E. Наявність будь-якого із цих антигенів дає підставу віднести донора до резус-позитивного типу [7,9].

Крім антигену D при переливанні донорських еритроцитів (особливо коли мова йде про дітей та жінок фертильного віку), в ряді країн враховують і інші антигени системи резус: C, c, E, e, іноді Cw, які теж мають імуногенні властивості. Трансфузія еритроцитів з урахуванням резус-фенотипу пари донор-реципієнт, підвищить імунологічну безпеку трансфузій [5,6]. Маркування донорської крові, створення реєстру фенотипованих донорів спростить підбір сумісного донора в разі необхідності переливання еритроцитів сенсibilізованим реципієнтам, і, після фенотипування еритроцитів реципієнта, значно зменшить кількість донорів, відібраних для сумісництва, що значно підвищить економічний ефект.

Для визначення фенотипу еритроцитів за системою резус існують МКА різних фірм, їх використовують в реакціях на площині, в пробірках або в гелі.

I, нарешті, всю донорську кров необхідно тестувати за антигеном K системи Келл, який містять у своєму фенотипові в середньому 10% європейців, його імуногенність стоїть на другому місці після антигену D системи резус. K-позитивні еритроцити донора мають вилучатися і не видаватися в лікувальні заклади, або використовуватись цілеспрямовано для K-позитивних реципієнтів, або, в разі необхідності, переливатись тільки несенсиibilізованим хворим, чоловікам, жінкам старше 50 років і ні в якому разі дітям, особливо дівчаткам, і жінкам фертильного віку [9, 12-14].

Визначатись антиген K може МКА різних фірм в реакціях на площині, пробірках, планшетах, в гелі.

Сироватка крові усіх донорів гемокомпонентів обов'язково повинна перевірятись на наявність антиеритроцитарних імунних антитіл, незалежно від групової чи резус-належності [7, 9, 10]. Типовою помилкою закладів служби

крові є проведення скринінгу антитіл тільки у випадку резус-негативної належності донора. Дійсно, близько 80% серед виявлених алоімуних антитіл мають анти-D спрямування. Проте інші 20% мають наступні специфічності: анти-K, анти-c, анти-E та проти інших мінорних антигенів. Такі антитіла зустрічаються у Rh⁺ осіб у 13 разів частіше, ніж у rh⁻. Це свідчить, що резус-позитивні особи є такі ж вразливі до алоімунізації антигенами еритроцитів, як і резус-негативні. Тобто у такому разі кожен п'ятий випадок наявності у донора антитіл ризикує бути невиявленим [6]. Згідно отриманих нами результатів НДР «Розробити заходи профілактики імунологічних ускладнень при гемотрансфузійній терапії», виконаної у рамках міжгалузевої комплексної програми «Здоров'я нації», частка імунізованих донорів в Україні складає близько 4,3% [6]. Попередження несумісності, пов'язаної із присутністю антитіл у крові донора, можливе тільки одноразово, при проведенні скринінгу антитіл на етапі обстеження донора, оскільки всі проби на сумісність пари донор-реципієнт не передбачають залучення сироватки (плазми) донора. Виявлення клінічно значимих антитіл необхідно проводити у непрямій пробі Кумбса (золотий стандарт) або, у випадку відсутності такої можливості, – у реакції конглютинації з додаванням желатину (застосування цієї реакції виправдано тільки на перехідному етапі реформування служби крові). Для скринінгу антитіл (виключно у донорів!) можна застосовувати тільки один різновид стандартних еритроцитів, який містить усі клінічно важливі антигени в одиничній дозі, або ж від двох донорів, зібраних в пул в рівних об'ємах [9]. За кордоном, в залежності від показника імуних антитіл, здійснюють чіткий диференційований підхід до застосування отриманого гемокомпоненту із врахуванням віку майбутнього реципієнта.

Задача закладів служби крові – виявити клінічно значимі антитіла у донорів, які можуть загрожувати безпеці реципієнта. Невиявлення слабкоаглютинабельних форм антитіл не має особливого значення для реципієнтів старших вікових категорій, оскільки в кровоносну систему

реципієнта попаде їх невелика кількість, гемоліз буде мінімальний, навіть за умови наявності відповідного антигену, а імунізація неможлива.

Більш ретельний підхід до виявлення антитіл слід застосовувати у випадку заготівлі гемокомпонентів для новонароджених, адже навіть мінімальні кількості антитіл можуть спричинити важкі посттрансфузійні ускладнення, в такому випадку обстеження краще здійснювати за допомоги спеціальної панелі еритроцитів для скринінгу та в чутливій технології (НАГТ в пробірочному тесті, гелевій технології) [8]. У випадку самого факту присутності імунних антитіл у донора, консервована кров та її компоненти, заготовлені від нього, не використовуються для потреб новонароджених.

Первинних донорів слід перевіряти при кожній донації, активних (у разі попередньої відсутності антитіл) – 1 раз на рік. Якщо активний донор повідомляє про можливі фактори його сенсibiliзації (вагітність, пологи, гемотрансфузії) йому проводять додатковий скринінг. Багато закладів служби крові впровадили тактику обов'язкового постійного тестування всієї донорської крові. Якщо у донора виявлять імунні антитіла, його перевіряють при кожній донації. Заклад служби крові не видає таку плазму, кріопреципітат та концентрат тромбоцитів, допускається тільки приготування відмитих або розморожених еритроцитів. Плазму із виявленими антитілами використовують для виготовлення імунологічних стандартів, навчальних цілей, а чоловіки-донори можуть бути залучені для подальшої імунізації з метою виготовлення імуноглобуліну анти-D [7, 9].

Отже, впровадження сучасних методів імуногематологічних обстежень донорів, підвищення теоретичного та практичного рівня підготовки персоналу імуногематологічних лабораторій є необхідною запорукою підвищення якості роботи служби крові та забезпечення імунологічної безпеки трансфузій.

Література

1. Донсков С. И. Группы крови человека: руководство по иммуносерологии / С.И. Донсков, В.А. Мороков. – М.: ИП Скороходов, 2011. – 1015 с.
2. Минеева Н.В. Группы крови человека. Основы иммуногематологии / Минеева Н.В. – СПб., 2010. – 188 с.
3. Трансфузиология : национальное руководство / [под. ред. проф. А.А. Рагимова]. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 1184 с.
4. Павлюк Р.П. Встановлення резус-належності у випадку слабких або варіантних форм антигена D та їхня частота серед населення Центрально-Українській геногеографічної зони / Р.П.Павлюк, У.В.Тимошенко // Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. – 2010. – Вип. 35. – С.222 – 230.
5. Павлюк Р.П. Фенотипування еритроцитів – шлях до підвищення імунологічної безпеки гемотрансфузій / Павлюк Р.П. // Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. – 2009. – Вип. 34 (додатковий). – С.194-197.
6. Павлюк Р.П. Минимизация негативних иммунологических последствий гемотрансфузионной терапии / Р.П.Павлюк, Г.А.Мироненко, У.В.Тимошенко // Актуальні питання клінічної та виробничої трансфузіології : збірник матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю (Харків, 5-6 червня 2014 р.). – Харків, 2014. – С.185-187.
7. Порядок проведення імуногематологічних досліджень крові донорів і реципієнтів у закладах служби крові та в лікувально-профілактичних закладах: методичні рекомендації / П.М.Перехрестенко, А.М.Чугрієв, Р.П. Павлюк [та ін.] – К., 2010. – 51 с.
8. Гелевая методика скрининга аллоиммунных антител как залог иммунологической безопасности гемотрансфузий / Л.Г.Медянцева, Н.Н.Левина, Э.С.Кадырбердеева, [и др.] // Вестник гематологии. – 2011. – №4., т. VII. – С.60 – 61.

9. Національне керівництво з виробничої трансфузіології для закладів, підрозділів та лабораторій служби крові / ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України» ; ХМАПО МОЗ України ; Харків. Обл.. центр служби крові. – Харків : Золоті сторінки, 2015. – 336 с.

10. Порядок медичного обстеження крові та (або) її компонентів (затверджено наказом МОЗ №385 від 16.08.2005). – К., 2006.

11. Rh Blood Group Antigens – Update / S.Von Kiparski, H.Northoff, W.A.Flegelel, [et al.] // Clin.Lab. – 2000. – Vol. 46, Issue 17. – P. 17-22.

12. Standards for Blood Banks and Transfusion Services / AABB (American Association of Blood Banks). – [30th ed.]. – AM ASSN BLOOD, 2016. – 120 p.

13. Technical Manual / AABB (American Association of Blood Banks) [ed. by Mark K. Fung, Brenda J. Grossman, Christopher Hillyer et al.]. – [18th ed.]. – AM ASSN BLOOD, 2014. – 840 p.

14. Wintrobe's clinical hematology / [ed. by John P. Greer, Daniel A. Arber, Bertil Glader et al.]. – [13th ed.]. – Philadelphia : LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2014. – 2278 p.

Надійшла 10.10.2017 року.

УДК 615.38(477)

АНАЛІЗ ДІЯЛЬНОСТІ ЗАКЛАДІВ СЛУЖБИ КРОВІ УКРАЇНИ У 2016 РОЦІ

П. М. Перехрестенко, В. М. Самусь, О. М. Аладьєва

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. Аналіз та оцінка діяльності закладів служби крові – значне теоретичне та практичне підґрунтя для планування роботи самої служби і для оцінки та планування ресурсних можливостей напрямів медицини, що пов'язані з результатами роботи служби як в регіонах, так і в цілому по Україні. Аналітичні матеріали призначені для керівників управлінь охорони здоров'я, головних обласних та міських трансфузіологів, гематологів, хірургів, акушерів-гінекологів, анестезіологів-реаніматологів, фахівців інших спеціальностей.

Ключові слова: донори, донації, кров, плазма, еритроцитна маса, тромбоцити, продукція на одного працюючого.

ANALYSIS OF THE ACTIVITIES OF UKRAINE'S BLOOD SERVICE ACTIVITIES IN 2016

P. M. Perekhrestenko, V. M. Samus, O. M. Aladyeva

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

***Summary.** The analysis and evaluation of the activities of the blood establishments is a significant theoretical and practical basis for planning the work of the service itself and for assessing and planning resource resources of the areas of medicine, areas related to the results of the service, both in the regions and in the whole of Ukraine. Analytical materials are intended for heads of health departments, major regional and city transfusionists, hematologists, surgeons, obstetricians-gynecologists, anesthesiologists, intensive care specialists, specialists in other specialties.*

***Key words:** donors, donations, blood, plasma, erythrocyte mass, platelets, products per worker.*

Вступ. Служба крові є одним з важливих пріоритетних напрямків медицини, який має стратегічне значення, особливо в теперішній час, коли відбуваються військові дії на Сході України. Вона повинна забезпечити надання трансфузіологічної допомоги хворим та постраждалим, від чого залежить не тільки здоров'я пацієнтів, а нерідко і їх життя.

На жаль, останні десятиріччя характеризується негативним ставленням держави до потреб закладів служби крові. Фінансування центрів та станцій переливання крові відбувається за залишковим принципом. Це призвело до погіршення показників їх діяльності.

Мета. Проаналізувати діяльність центрів та станцій переливання крові, відділень трансфузіології лікувальних закладів (ВТЛЗ) областей, м. Києва та закладів, безпосередньо підпорядкованих Міністерству охорони здоров'я України, Національній академії медичних наук України, Міністерству оборони України.

Матеріали і методи. Аналіз проведено на підставі звітів «Галузева статистична звітність – форма № 39–здоров», «Звіт центру служби крові (станції переливання крові), відділення трансфузіології лікувального закладу, установи, лікарні, яка проводить заготівлю крові» областей, м. Києва та закладів, безпосередньо підпорядкованих Міністерству охорони здоров'я

України, Національній академії медичних наук України, Міністерству оборони України. Проведено статистичну обробку одержаних матеріалів.

Результати та обговорення. Станом на 1 січня 2017 року в Україні функціонували 44 центри (станції переливання крові) – із них: 24 обласних і 19 міських центрів, 1 відомчий – Міністерства оборони. Крім того, було 315 ВТЛЗ, серед них: 5 підпорядковані МОЗ України і 6 – НАМН України. Заготівлю крові проводили 77 лікарень.

У зв'язку з оптимізацією мережі та передачею в інше підпорядкування закладів служби крові Укрзалізниці кількість центрів (СПК) у 2016 році зменшилась на 5, ВТЛЗ – на 7, лікарень, що заготовляють кров, – на 6.

У закладах служби крові нараховувалося 7425,5 штатних посад у (у 2015 році – 7647,25), із них: лікарів – 1357,5 (у 2015 році – 1398,5), в тому числі зайнято біологами – 252,5 посади; середнього медичного персоналу – 2510,5 (у 2015 році – 2587,75). Укомплектованість штатних посад склала 90,2% (у 2015 році – 91,3%), із них лікарями – 68,0% (у 2015 році – 68,9%), середнім персоналом – 82,5% (у 2015 році – 85,4%).

На заготівлю крові та її компонентів у 2016 році, як і у 2015 році, було спрямовано 53,0% штатних одиниць, на виготовлення препаратів плазми крові – 8,0% (у 2015 році – 9,6%) від загальної кількості посад. Це зумовлено значним скороченням номенклатури та кількості препаратів, які вироблялись центрами крові.

Оснащеність закладів служби крові України. Усі заклади служби крові мають апарати для проведення автоматичного плазмаферезу та цитаферезу. Лабораторіями ПЛР укомплектовані – 3 центри служби крові (Запорізький, Київський обласний та ВТЛЗ МОЗ України).

Аналіз показників виготовлення продукції на одного працюючого в закладах служби крові. В середньому в Україні на одного працюючого в службі крові в 2016 році заготовлено 40,3 л крові і 27,6 л плазми. В зв'язку зі змінами

порядку обліку крові порівнювати з 2015 роком цей показник не коректно, а заготівля плазми збільшилась на 3,7 л.

По заготівлі крові на одного працюючого найкращі показники в Луганській (71,0 л), Миколаївській (62,6 л), Хмельницькій (53,2 л), Дніпропетровській (50,7 л) областях. Нижчі середніх по Україні показники в Тернопільській (17,1л), Херсонській (26,0 л), Рівненській (26,8 л), Львівській (29,8 л) областях.

Аналіз заготівлі плазми на одного працюючого показав, що в Сумській області цей показник більше середнього по Україні майже в 10 разів (230,5 л). Високі показники, також в Миколаївській (47,3 л), Дніпропетровській (33,1 л), Луганській (32,5 л) областях. Значно нижчі показники від середніх по Україні в Кіровоградській (9,9 л), Рівненській (13,2 л), Львівській (13,6 л), Черкаській (14,6 л) областях (табл. 1).

Загальна кількість донорів порівняно з 2015 роком зменшилась на 26496 осіб або на 6,5%. Зменшення пройшло практично по всіх регіонах, крім Донецької, Львівської, Одеської, Полтавської, Харківської, Черкаської областей та м. Києва.

Донори крові від загальної кількості становили 89,1%, донори плазми – 9,2%, донори клітин крові – 1,7% (рис. 1).

Таблиця 1 - Ефективність діяльності закладів служби крові регіонів України

№ п/п	Регіон (область)	Показники діяльності служби крові регіону			
		На 1 зайняту посаду		На 1 апарат аферезу	
		Кількість донацій	Кількість консервованої крові, літри	Плазми, одержаної апаратним аферезом, літри	Тромбоцитів, одержаних апаратним аферезом, دوزи
1	Вінницька	82	39,4	112,7	783
2	Волинська	87	34,8	171,2	420
3	Дніпропетровська	123	50,7	286,7	305
4	Донецька	72	34,9	354,7	108

5	Житомирська	69	30,2	272,1	626
6	Закарпатська	76	33,3	135,7	191
7	Запорізька	82	35,9	498,3	391
8	Івано-Франківська	91	35,4	160,1	700
9	Київська	86	40,7	19,7	230
10	Кіровоградська	55	25,4	11,0	110
11	Луганська	132	71,0	115,0	120
12	Львівська	64	29,8	133,6	596
13	Миколаївська	161	62,6	518,2	454
14	Одеська	74	34,7	120,0	185
15	Полтавська	79	35,1	47,0	789
16	Рівненська	60	26,8	118,9	190
17	Сумська	379	39,3	882,5	460
18	Тернопільська	51	17,1	663,6	124
19	Харківська	76	30,4	417,8	765
20	Херсонська	57	26,0	212,6	31
21	Хмельницька	116	53,2	83,8	93
22	Черкаська	66	30,5	166,6	220
23	Чернівецька	70	32,3	202,4	238
24	Чернігівська	99	42,2	300,8	12
25	м. Київ	86	40,5	39,2	816
	Україна	90	40,3	371,5	348

Середній відсоток донорів від загальної кількості населення регіонів у 2016 році склав 0,97% (у 2015 році становив 1,03%). Вище середнього по Україні цей показник був у Хмельницькій (1,96%), Запорізькій (1,73%), Волинській (1,58%), Миколаївській (1,45%) областях. Найнижчий показник – у Донецькій (0,33%), Луганській (0,55%), Херсонській (0,71%) областях, м. Києві (0,72%), Харківській (0,72%), Одеській (0,72%) областях (табл. 2).



Рис. 1. Донори крові, плазми, клітин крові.

Для порівняння в 2013 році в країнах ЄС питома вага донорів в середньому становила 2,4% від кількості населення. Рівнем самодостатності забезпечені продуктами крові вважається 3,0% і більше донорів. Показник 1,0% донорів від населення оцінюється як такий, що створює проблеми із забезпеченням країни кров'ю, її компонентами та препаратами.

У 2016 році кількість донорів плазми в Україні збільшилась на 5841 особу. Імунні донори були лише у трьох областях: Сумській – 217 донорів, Донецькій – 13 донорів, Львівській – 8 донорів.

Кількість донорів крові, клітин крові та плазми становила 601107 (що на 22813 менше, ніж у 2015 році), із них: кроводач – 494782, плазмодач – 95141, донорів клітин крові – 11184 (рис. 2).

Донації на 1000 осіб населення України у 2016 році склали – 14,2 (у 2015 році – 14,6), із них: кроводач 11,04 (у 2015 році – 11,40) та 2,21 плазмодач (у 2015 році – 2,11).

Кількість донорів крові в країнах ЄС в 2013 році дорівнювала 36 на 1000 населення. На європейському рівні за кількістю донорів на 1000 населення показник тільки в Сумській області – 38,88 (за рахунок плазмаферезу – 30,27).

Двадцять і більше донацій на 1000 населення ще в 5 областях (Хмельницька – 24,76, Волинська – 24,71, Миколаївська – 24,15, Запорізька – 22,77, Дніпропетровська – 19,95). В чотирьох регіонах цей показник менше 10 (Луганська – 5,48, Донецька – 7,24, Львівська – 9,50 області та м. Київ – 9,17) (табл. 2).



Рис. 2. Донації крові, плазми, клітин крові.

Кількість відведених від донацій донорів у порівнянні з 2015 роком зменшилась на 1073 особи і становить 33489 осіб (8,1%) від усіх донорів.

Середня доза кроводачі у 2016 році по країні була 418,7 мл, у 2015 році – 445,0 мл.

У 2016 році заготовлено 257238,6 л консервованої донорської крові. Значне зменшення заготівлі пов'язане зі змінами в обліку. У 2015, як і у попередні роки, кров, яка пройшла через апарати плазма– та цитаферезу, зараховувалась, як заготовлена. Із загальної її кількості на виготовлення компонентів та стандартних сироваток використано 98,3% (247795,5 л).

Необхідно особливо відзначити, що у 2016 році всі регіони, крім Чернігівської області, відмовилися від трансфузій цільної крові. В Чернігівській області перелили 53,2 л цільної крові, що значно менше, ніж в 2015 році (95,2 л).

Брак консервованої донорської крові у 2016 році склав 1,36% – це 3510,4 л. Великий відсоток браку крові спостерігався у зв'язку з виявленням антитіл до вірусу гепатиту С – 507,2 л (0,2%), поверхневого антигену вірусу гепатиту В – 348,6 л (0,14%), блідої спірохети – 290,6 л (0,11%). Брак крові з причин виявлення антитіл до ВІЛ ½ склав 131,2 л (0,05%). Неможливо залишити поза увагою брак з причин підвищення показників АлАТ 760,6 л (0,3%).

Компоненти крові. У 2016 році заготовлено 121586,6 л еритроцитної маси. Лікувально-профілактичними закладами для трансфузій використано тільки 63,8% (77632,6 л). З різних причин забраковано 9,5% (6679,6 л). У зв'язку з закінченням терміну зберігання було списано 11,9% еритроцитної маси, що склало 14468,3 л (у 2015 році було утилізовано 18416,1 л).

В 2016 році в Україні заготовлено 162519,3 л плазми крові (що менше на 2471,0 л ніж в 2015 році). В середньому вихід плазми з одного літру консервованої крові склав 47,0% (466,5мл).

Мануальним та автоматичним плазмаферезом одержано 52959,9 л плазми, або 32,6% від всієї заготовленої (у 2015 році цей відсоток становив 29,7%). Ця тенденція дуже позитивна і на пряму корелює з показником утилізації еритроцитної маси (в 2016 році еритроцитної маси утилізовано майже на 4000 л менше, порівняно з 2015 роком). Методом автоматичного плазмаферезу одержано – 28,8% (46804,7 л) плазми від об'єму всієї заготовленої, а мануальним плазмаферезом – 3,8% (6155,2 л)

Середні дози плазми крові донорів при проведенні автоматичного плазмаферезу склали 646,6 мл (у 2015 році – 649,9 мл), однократного мануального плазмаферезу – 272,9 мл, двократного мануального плазмаферезу – 511,1 мл.

Брак плазми крові від всієї заготовленої в 2016 році склав 5,0% (у 2015 році – 5,1%), тобто 8086,6 л виявилися непридатними для використання. Більше всього забраковано плазми з причини виявлення антитіл до вірусу гепатиту С 14,7% (1186,2 л), поверхневого антигену вірусу гепатиту В 12,2% (988,0 л),

антитіл до блідої спірохети 9,9 % (803,5 л). Брак із причин виявлення антитіл до ВІЛ ½ склав 6,1% (496,0 л). Високі показники АлАТ при заготівлі плазми виявлені у 20,0% (1620,3 л), білірубину – у 1,7% (139,4 л).

Карантинізація плазми проводилась у всіх закладах служби крові України. На карантинізацію було закладено 154192,9 л (94,9%) (у 2015 році – 155667,0 л (94,3%)) плазми від заготовленої. У лікувально-профілактичні заклади для трансфузій видано 47,2% (72805,1 л) карантинізованої плазми (2015 рік – 46,3%; 72006,8 л). На виготовлення препаратів використано 14,4% (36463,9 л), а у 2015 році – 14,1% (35662,1 л) карантинізованої плазми. Максимальний відсоток карантинізованої плазми у Чернігівській (98,8%), Сумській (98,6%), Харківській (97,7%), Хмельницькій (97,3%) областях.

Після карантинізації забраковано 2031,7 л (1,3%). Карантинізована плазма вибраковувалась при виявленні у донорів поверхневого антигену вірусу гепатиту В (16,7%), антитіл до вірусу гепатиту С (12,1%), антитіл до блідої спірохети (8,9%), ВІЛ ½ (7,6%), високих показників АлАТ (3,5%).

Виробництво препаратів плазми. Із усієї заготовленої плазми закладами служби крові на препарати використано 22,5% (у 2015 році – 22,4%), на компоненти – 46,1% (у 2015 році – 46,5%), на стандартні сироватки 0,3% (у 2015 році також 0,3%).

Заготівля та використання концентрату тромбоцитів. У 2016 році заготовлено 31140,6 дози тромбоцитів, із них: концентрату з 500мл консервованої крові – 9979,0 доз, аферезних тромбоцитів – 19480,6 дози. Використано для трансфузій у лікувально-профілактичних закладах 82,9% (25823,0 дози) заготовленого концентрату тромбоцитів.

Таблиця 2 - Основні показники забезпеченості на 1000 населення регіонів України

№ п/п	Регіон (область)	Донори	Донації	Кров консервована, літри	Плазма, літри	Концентрат тромбоцитів, дози	Кріопреципітат, дози	Альбумін 10%, літри
1	Вінницька	9,3	10,8	5,2	2,6	0,6	1,38	0,13
2	Волинська	15,8	24,7	9,9	5,0	0,5	0,2	0,58
3	Дніпропетровська	13,8	20,0	8,2	5,4	0,7	1,59	0,34

4	Донецька	3,3	7,2	3,5	1,8	0,2	-	-
5	Житомирська	8,2	9,9	4,3	2,6	0,5	0,63	0,19
6	Закарпатська	7,4	10,5	4,6	2,3	0,2	0,2	0,23
7	Запорізька	17,3	22,8	9,9	6,0	0,6	0,79	0,31
8	Івано-Франківська	10,2	13,1	5,1	2,5	0,5	0,7	0,19
9	Київська	8,2	10,9	5,1	2,7	1,2	0,44	-
10	Кіровоградська	9,8	11,6	5,3	2,1	0,4	-	-
11	Луганська	5,5	5,5	3,0	1,4	0,1	0,04	-
12	Львівська	9,1	9,5	4,4	2,0	0,5	-	0,09
13	Миколаївська	14,5	24,2	9,4	7,1	0,9	0,43	0,37
14	Одеська	7,2	11,8	5,5	3,0	0,4	-	0,14
15	Полтавська	9,5	13,7	6,1	3,1	0,7	0,12	-
16	Рівненська	8,3	11,0	4,9	2,4	0,4	0,49	0,24
17	Сумська	9,7	38,9	4,0	23,6	0,5	-	-
18	Тернопільська	8,4	11,5	3,9	3,6	0,2	-	0,4
19	Харківська	7,2	11,3	4,5	3,6	0,6	0,5	0,56
20	Херсонська	7,1	12,3	5,6	3,2	0,5	0,02	0,38
21	Хмельницька	19,6	24,8	11,4	5,1	0,5	0,68	0,52
22	Черкаська	9,6	12,3	5,7	2,7	0,5	0,35	-
23	Чернівецька	7,4	11,5	5,3	2,9	0,6	0,25	0,06
24	Чернігівська	10,2	14,3	6,1	3,4	0,3	0,51	0,23
25	м. Київ	7,2	9,2	4,3	2,1	0,6	0,04	-
	Україна	9,7	14,2	8,9	3,8	0,7	0,37	0,18
	ЄС (2013 р.)	24,0	36,0					

Висновки

Служба крові України потребує корінної реорганізації. На наш погляд, слід першочергово забезпечити централізоване управління з належним фінансуванням з державного бюджету закладів, котрі заготовляють кров та її компоненти.

Створення Національного трансфузіологічного центру, як керівного координаційного органу, надасть можливість впровадити сучасні технології заготівлі донорських компонентів крові, що в свою чергу, забезпечить їх якість.

З метою підвищення безпеки донорської крові необхідно перейти до добровільного безоплатного донорства, розробити та затвердити реєстр донорів України.

Література

1. Закон України від 23.06.1995 р. №239/95 ВР «Про донорство крові та її компонентів» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/239/95-вр>

2. Наказ МОЗ України від 01.08.2005 №385 “Про інфекційну безпеку донорської крові та її компонентів”; “Порядок медичного обстеження донорів крові та (або) її компонентів” [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://moz.gov.ua/ua/portal/dn_20050801_385.html

3. Наказ МОЗ України 19.08.2005 р. №415 «Про удосконалення добровільного консультування і тестування на ВІЛ-інфекцію» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20050819_415.html

4. Наказ МОЗ України 09.03.2010 р. №211 «Про затвердження Порядку контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові та її компонентів» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0368-10>

5. Наказ МОЗ України від 19.02.2013 №134 “Про затвердження Порядку скринінгу донорської крові та її компонентів на гемотрансмісивні інфекції” [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20130219_0134.html

6. Наказ МОЗ України від 17.12.2013 р. №1093 «Про затвердження інструкцій з виготовлення, використання та забезпечення якості компонентів крові» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20131217_1093.html

7. Обов'язкове забезпечення потреб охорони здоров'я населення в донорській крові, її компонентах і препаратах на 2016 рік (розпорядження Кабінету Міністрів України від 4 лютого 2016 року № 93-р).

8. Обсяги обов'язкового забезпечення потреб охорони здоров'я населення донорською кров'ю, її компонентами і препаратами на 2017 рік (розпорядження Кабінету Міністрів України від 8 лютого 2017 року № 90-р).

9. The collection, testing and use of blood and blood components in Europe, 2013, Report [Electronic resource]. – Access mode: www.edqm.eu/sites/default/files/the_collection_testing_and_use_of_blood_and_blood_components_in_Europe_2013_report. – Title from screen.

10. Чугрієв А. М. Макрооцінка діяльності регіональних служб крові України / А. М. Чугрієв // Україна. Здоров'я нації. - 2017. - № 3. - С. 292-297. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Uzn_2017_3_51.

Надійшла 17.10.2017 року.

УДК 576.8.06+616-08-06

ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРУ ТА ПЛОЩІ БІОПЛІВКИ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ У КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

А. П. Рибальська, Л. М. Немировська, О. І. Газя, О. А. Мельник

Н. К. Скачкова

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. Мета. Розробити доступний для виконання у практичних бактеріологічних лабораторіях, у тому числі й регіональних, метод визначення розміру та площі біоплівки клінічних штамів мікроорганізмів.

Матеріали та методи. Об'єкт дослідження - клінічні штами мікроорганізмів роду *Staphylococcus* (22) та дріжджоподібних грибів роду *Candida* (13), що ізольовані від хворих на гостру та хронічну лейкемію. Здатність до біоплівкоутворення досліджували за методом O'Toole G.A. et al у власній модифікації.

Результати. Представлено дослідження щодо оцінки біоплівкоутворення клінічних штамів мікроорганізмів за розміром біоплівки (%) та/або за площею (см²), що дозволяє швидко оцінити інфекційний потенціал чинників. Показано, що 90 % досліджених штамів стафілококів мають високий рівень біоплівкоутворення, у тому числі, штами *S. epidermidis* і *S. saprophyticus*, що часто присутні у складі мікробіоценозу біотопів людини. Серед дріжджоподібних грибів роду *Candida* за високим рівнем біоплівкоутворення визначено *C. kefyr*, *C. albicans*; середнім - *C. glabrata*, *C. krusei*.

Висновки. Метод дає змогу виміряти розмір (%) та площу біоплівки (см²), що її утворюють клінічно значущі мікроорганізми. Використання методу у клінічній практиці дасть змогу поліпшити терапію основного захворювання за рахунок скорочення витрат, що пов'язані з лікуванням хворих з інфекційно-запальними ускладненнями та, в умовах відсутності високовартісного обладнання, оцінити патогенний потенціал збудників інфекційно-запальних процесів.

Ключові слова: хворі на лейкемію з інфекційно-запальними ускладненнями, мікроорганізми, біоплівкоутворення.

DETERMINATION OF SIZE AND PLANTS OF BIOFILMS MYCROORGANISM PATTERNS IN CLINICAL PRACTICE

A. Rybalskaya, L. Nemyrovskaya, O. Gaziya, O. Melnyk, N. Skachkova

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. Aim. *It is affordable to implement in practical bacteriological laboratories, including regional ones, a method for determining the size (%) and area (sm²) of the biofilm of clinical strains of microorganisms.*

Materials and methods. *The object of the study - clinical strains of microorganisms of the genus Staphylococcus (22) and yeast-like fungi of the genus Candida (13), isolated from patients with acute and chronic leukemia. The ability to biofilm formation was investigated by the O'Toole G.A. et al method in our modification.*

Results. *The method of evaluation of biotechnology formation of clinical strains of microorganisms according to the size of biofilm (%) and / or area (sm²) is presented, which allows to quickly evaluate the infectious potential of factors. It has been shown that 90% of the staphylococcus strains studied have high levels of biofilm formation, including strains S. epidermidis and S. saprophyticus, which are often present in the microbiocenose of human biotope. Among the yeast-like fungi of the genus Candida, with high levels of biofilm formation, C. kefyr, C. albicans; medium - C. glabrata, C. krusei.*

Conclusions. *The method makes it possible to measure the size (%) and the area (sm²) of the biofilm, which form clinically significant microorganisms. The use of the method in clinical practice will improve the treatment of the underlying disease by reducing the costs associated with the treatment of patients with infectious and inflammatory complications and, in the absence of expensive equipment, to assess the pathogenic potential of pathogens infectious and inflammatory processes.*

Key words: *patients with leukemia with infectious and inflammatory complications, microorganisms, biofilm formation.*

Вступ. Актуальність дослідження обумовлена необхідністю визначення здатності умовно патогенних бактерій до біоплівкоутворення як прогностично несприятливого фактора щодо ускладненого перебігу інфекційно-запальних процесів у пацієнтів з різними захворюваннями. Це є проблемою сучасної клінічної медицини і, зокрема, онкогематології. Не потребує доказів теза, що успіх лікування хворих з інфекційно-запальними ускладненнями різної локалізації залежить від своєчасної та адекватної діагностики чинників. Важливу роль у цьому процесі відіграють мікробіологічні дослідження, що спрямовані на визначення бактеріального спектра збудників, їх властивостей, особливо тих, що сприяють розвитку інфекційних процесів. Однією з таких негативних бактеріальних ознак є утворення біоплівки патогенними штамми

мікроорганізмів. Відомо, що переважна кількість бактеріальних культур здатна формувати біоплівки в умовах відповідних біотопів їх існування. Дослідження патогенезу різних захворювань свідчать про наявність майже 80% інфекційних ускладнень, обумовлених мікроорганізмами, що здатні утворювати біоплівку.

Впровадження сучасних технологій, зокрема, таких методів інтенсивної терапії як штучна вентиляція легенів, сприяє виживанню тяжкохворих пацієнтів. Однак, довготривале застосування даних методів підвищує ризики інфікування органів дихальної системи госпітальними штамами умовно патогенних культур. Це є значною проблемою, оскільки екзогенним джерелом інфікування легень може стати контаміноване повітря або вироби медичного призначення, що контактують зі слизовою оболонкою дихальних шляхів (ендотрахеальні трубки, катетери тощо), на внутрішній поверхні яких може утворюватися бактеріальна біоплівка, яка виконує роль постійного джерела інфекції [10].

Біоплівки – це високо впорядковані угруповання мікроорганізмів, що розташовані в матриксі синтезованих ними позаклітинних полімерних речовин та формуються на біологічних або штучних поверхнях завдяки адгезії й розмноженню. В біоплівках бактерії об'єднані складними міжклітинними зв'язками, мають високу резистентність до зовнішніх негативних чинників, що надає їм високого рівня виживаності та стійкості до дії дезінфікуючих речовин, антибактеріальних препаратів, бактеріофагів. Біоплівкоутворення вважається одним із факторів патогенності мікроорганізмів [1, 2, 3, 5, 11].

У науковій літературі наведено різні методи вивчення біоплівок (*in vitro*, *in vivo*). Більшість методів культивування біоплівок розроблялися з науковою метою для підтвердження їх існування та виявлення їхнього значення саме у патогенезі інфекційних захворювань. Це й динамічні методи, що максимально наближені до умов існування живих систем, і статичні - з використанням 96-лункових пластикових планшетів. Проте всі ці методи або потребують значних

фінансових витрат, або не уніфіковані для застосування у практичних лабораторіях [4, 6, 7, 8].

Мета. Розробити метод визначення розміру та площі біоплівки клінічних штамів мікроорганізмів, що є доступним для виконання у практичних бактеріологічних лабораторіях, у тому числі й регіональних.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження були клінічні штами мікроорганізмів роду *Staphylococcus* (n=22): *S. aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus* та дріжджоподібних грибів роду *Candida* (n=13): *C.albicans*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.kefyr*, що були ізольовані з біотопів хворих на гостру і хронічну лейкемію. Контролем слугували музейні штами – *S. aureus* 209P, *S. aureus* ATCC 25923, *C.albicans* ATCC 885-653. Здатність до біоплівкоутворення досліджували за методом O'Toole G. A. et al у власній модифікації [12].

Досліджено здатність наведених культур утворювати біоплівку, здійснено підбір фарбників та їх оптимальної концентрації для фарбування біоплівки відповідних груп мікроорганізмів (рис.1, 2).

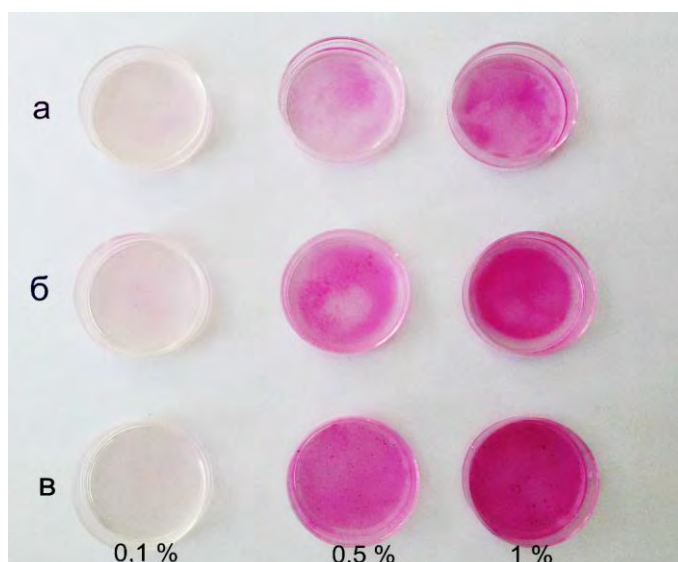


Рис. 1. Забарвлення біоплівок, що утворюють мікроорганізми роду *Staphylococcus* (штами: а – 481/4; б – 495/8; в – 490/1), за різних концентрацій фуксину Циля (0,1 %; 0,5 %; 1,0 %).

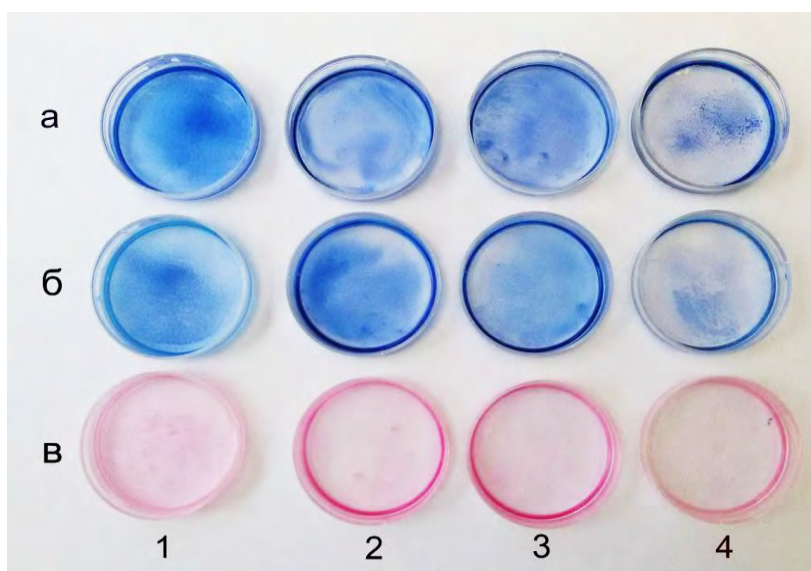


Рис. 2. Забарвлення біоплівки, що утворюють дріжджоподібні гриби роду *Candida* (штами: 1 – 467/1; 2 – 481/10; 3 – 473/4, 4 – *C. albicans* ATCC № 885-653) за різних концентрацій метиленового синього (а – 0,05 %; б – 0,01 %), в – 0,5 % розчині фуксину Циля.

Мікроорганізми культивували на відповідних для різних родів рідких поживних середовищах: цукровий бульйон – для стафілококів, бульйон Сабуро – для дріжджоподібних грибів. Носієм біоплівки були стерильні одноразові полістиролові чашки Петрі (d=40 мм).

Для цього 0,1 мл 18-24-годинної суспензії мікробних культур вносили у полістиролову одноразову чашку Петрі, що містила 2,5 мл відповідного поживного субстрату, інкубували 18-24 години: за температури 37°C – бактеріальні культури, за 25°C – дріжджоподібні гриби, після чого видаляли планктонні мікроорганізми, а біоплівки, що сформувалися, фарбували, використовуючи 0,5% розчин фуксину Циля для бактеріальних культур, 0,01% метиленової сині – для дріжджів. Експонували 30 хвилин за відповідної температури, зайвий барвник видаляли, чашки підсушували. Розмір біоплівки (%) визначали за допомогою пластикового шаблону, який підкладали під зворотну поверхню чашки. Діаметр шаблону відповідає діаметру чашки Петрі та має вигляд пластикового кола, що розподілено на чотири однакових (по 25%) сектора (рис.3). Шаблон для вимірів може бути виготовлений

дослідником самостійно із пластику або іншого матеріалу, який підлягає знезараженню.

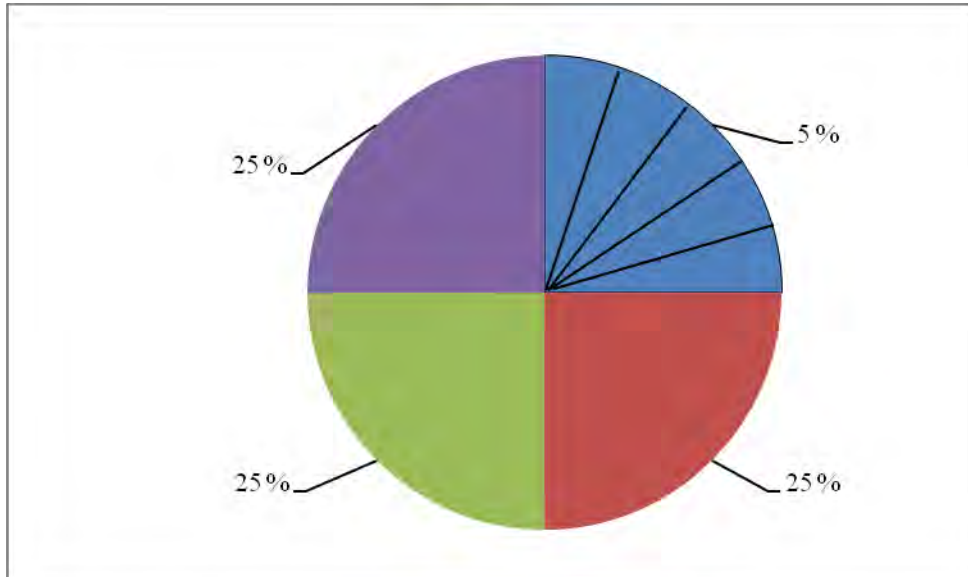


Рис. 3. Шаблон для виміру розміру біоплівки ($d = 40$ мм).

Результати та їх обговорення. Результати оцінювали за розробленою шкалою: здатність до біоплівкоутворення вважали високою, якщо біоплівка мала розмір (100-75)%; середньою – (74-50)%; низькою – (<50-25)%. Здатність до формування біоплівки вважали недостатньою, якщо окремі конгломерати займали менше, ніж 25% агарової поверхні чашки Петрі.

Площу біоплівки обчислювали за формулою: $S = \pi r^2$ (cm^2), виходячи з того, що максимальна площа біоплівки усієї поверхні чашки Петрі ($d=40$ мм) складає, відповідно: $S = \pi r^2 = 3,14 \cdot 2^2 = 12,56 \text{ cm}^2$.

Оцінювати здатність мікроорганізмів до біоплівкоутворення можливо як за одним, так і за двома параметрами: або розмір (%), або площа (cm^2), що однаково дає уяву про патогенні властивості клінічних штамів. Результати дослідження наведено у таблицях 1, 2.

Таблиця 1 – **Біоплівкоутворення клінічних штамів роду *Staphylococcus***

№ п/п	Рід <i>Staphylococcus</i>	Біоплівка		Рівень біоплівкоутворення
		розмір, %	площа, см ²	
1.	<i>S. aureus</i> 514/1	70	8,79	Середній
2.	<i>S. epidermidis</i> 495/8	95	11,93	Високий
3.	<i>S. epidermidis</i> 481/4	90	11,30	Високий
4.	<i>S. epidermidis</i> 512/1	80	10,05	Високий
5.	<i>S. epidermidis</i> 489/3	80	10,05	Високий
6.	<i>S. saprophyticus</i> 490/1	95	11,93	Високий
7.	<i>Staphylococcus</i> sp. 509/4	80	10,05	Високий
8.	<i>Staphylococcus</i> sp. 509/3	80	10,05	Високий
9.	<i>S. aureus</i> 209 P	80	10,05	Високий
10.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	80	10,05	Високий

Показано, що 90% досліджених штамів стафілококів, у тому числі як ті, що ізолювані від хворих на лейкемію, так і музейні культури, мають високий рівень біоплівкоутворення (розмір плівки 80-95 %; площа 10,05-11,93 см²). Слід звернути на увагу, що на фоні патогенного виду *S. aureus* 514/1 з середнім рівнем формування біоплівки (розмір 70%; площа 8,79 см²), чільне місце посіли штами *S. epidermidis* і *S. saprophyticus* – види, що вважаються сапрофітами та присутні у складі нормоценозу на шкірі, у біотопах верхніх дихальних шляхів людини. Цілком можливо, що високий рівень біоплівкоутворення таких штамів може сприяти розвитку інфекційно-запальних ускладнень у хворих на лейкемію, особливо на тлі хіміотерапії та вторинного імунодефіциту.

Цікавим є той факт, що серед дріжджоподібних грибів роду *Candida* на першому місці за високим рівнем біоплівкоутворення (розмір 100%; площа 12,56 см²) опинився вид кефірного грибку *C. kefyr* 481/10. Цей вид дріжджів зазвичай використовують для виробництва кисломолочних продуктів і, можливо, саме ця ознака є необхідною, щоб надати продукту якості функціонального харчування. Переважна кількість штамів дріжджоподібних грибів *C. albicans* (5) показали високий рівень біоплівкоутворення (розмір 80,0-87,5%; площа 10,05-10,99 см²), тільки один штам цього виду – середній (відповідно, 68%; 8,54 см²), так само як види *C. glabrata*, і *C. krusei* (відповідно, 70%; 8,79 см² і 60%; 7,56 см²).

Таблиця 2 – Біоплівкоутворення клінічних штамів дріжджів роду

Candida

№ п/п	Рід <i>Candida</i>	Біоплівка		Рівень біоплівкоутворення
		розмір, %	площа, см ²	
1.	<i>C. kefyr</i> 481/10	100	12,56	Високий
2.	<i>C. albicans</i> 477/9	87,5	10,99	Високий
3.	<i>C. albicans</i> 480/9	87,5	10,99	Високий
4.	<i>C. albicans</i> 467/1	85	10,68	Високий
5.	<i>C. albicans</i> 473/4	80	10,05	Високий
6.	<i>C. albicans</i> 492/6	80	10,05	Високий
7.	<i>C. krusei</i> 464/5	89	11,18	Високий
9.	<i>Candida</i> sp. 503/4	95	11,93	Високий
8.	<i>C. glabrata</i> 498/5	70	8,79	Середній
10.	<i>C. albicans</i> 478/11	68	8,54	Середній
11.	<i>C. krusei</i> 498/7	60	7,56	Середній
12.	<i>Candida</i> sp. 503/6	95	11,93	Середній
13.	<i>C. albicans</i> ATCC885-653	61	7,66	Середній

Таким чином, дані, що представлено, характеризують патогенні властивості клінічних штамів мікроорганізмів, які ізолюються з осередків інфекції у хворих на лейкемію і, вірогідно, сприяють розвитку інфекційно-запальних процесів та ускладненню терапії основного захворювання. Тому швидка оцінка патогенних властивостей клінічних культур має важливе значення.

Висновок

Запропонований метод не враховує густину біоплівки, проте дає змогу виміряти її розмір (%) та обчислити площу (см²), швидко оцінити здатність до біоплівкоутворення клінічно значущих мікроорганізмів. Метод простий, доступний для виконання у регіональних лабораторіях, які не мають спеціального обладнання, дозволяє лікарям-гематологам адекватно оцінити патогенний потенціал клінічних штамів мікроорганізмів за здатністю формування біоплівки та скоригувати антиінфекційне лікування за рахунок дозування й тривалості терапії.

Результати дослідження, що представлено у статті, захищено патентом України [9].

Література

1. Адгезивні властивості асоціації *Staphylococcus aureus* і *Candida albicans* / Мінухін В. В., Кочнева О. В., Граматюк С. М., Сухомлин М. П. // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 2 (100). – С. 89–91.

2. Гостев В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / Гостев В. В., Сидоренко С. В. // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2.– № 3. – С. 4-15.

3. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл / Рыбальченко О. В., Бондаренко В. М., Орлова О. Г. и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 6. – С.66-70.

4. Лямин А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы / Лямин А. В., Боткин Е. А., Жестков А. В. // Журнал клин. микробиол. антимикроб. терапия. – 2012. – Том 14. – № 1.– С. 17-22.

5. Особенности формирования микробных биопленок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок на желчных конкрементах / Винник Ю. С., Серова Е. В., Андреев Р. И. и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – С. 8.

6. Патент на корисну модель № 47944, Україна, МПК G 09B 23/00. Спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів / Циганенко А. Я., Мішина М. М., Курбанов Р. А.; заявник Харківський національний медичний університет; № заявки u200910353; заявл. 12.10.2009; опубл.25.02.2010, Бюл. № 4.

7. Патент на корисну модель № 89508, Україна, МПК C12Q 1/24. Спосіб визначення кількості життєздатних мікроорганізмів у складі біоплівки / Балко О. І., Балко О. Б., Авдєєва Л. В.; заявник Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України; № заявки u201312899; заявл. 06.11.2013; опубл. 25.04.2014, Бюл. № 8.

8. Патент на корисну модель № 89509, Україна, МПК C 12G1/24. Спосіб визначення інтенсивності біоплівкоутворення мікроорганізмів / Балко О. І., Балко О. Б., Авдєєва Л. В.; заявник Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К.

Заболотного НАН України; № заявки 201312900; заявл. 06.11.2013; опубл. 25.04.2014, Бюл. № 8.

9. Патент № 115970. Спосіб визначення розміру та площі біоплівки клінічних штамів мікроорганізмів / Рибальська А.П., Немировська Л. М., Газя О. І., Мельник О. А., Скачкова Н. К.; заявник та власник ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»; заявка № u 201606500; заявл. 14.06.2016; опубл. 10.05.2017, Бюл. № 9.

10. Трофіменко Ю. Ю. Біологічні властивості мікрофлори, що колонізує ендотрахеальні інкубаційні трубки у відділеннях інтенсивної терапії: Дис. канд. мед. наук. - 2015. - 127 с.

11. Lisa H Amir. The role of microorganisms (Staphylococcus aureus and Candida albicans) in the pathogenesis of breast pain and infection in lactating women / Lisa H. Amir, Cullinane Meabh // Pregnancy and Childbirth. – 2011. – Vol. 10. – P. 1186.

12. O'Toole G. A. Biofilm formation microbial development / O'Toole G. A., Kaplan A. N., Kolter R. // An. Rev. Microbiol. – 2000. – № 4. – P. 49–76.

Надійшла 10.10.2017 року.

УДК 616-006.44+616-005

ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ХВОРИХ НА ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНІ НОВОУТВОРЕННЯ

С.Ю. Сергутіна, С.В. Бурнаєва, С.О. Сівкович

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. Мета. Оцінити коагулологічний потенціал крові у хворих на лімфопроліферативні новоутворення (ЛПН) на різних етапах хіміотерапії (ХТ).

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 40 хворих на ЛПН, із яких у 20 було діагностовано В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (В-ХЛЛ), у 19 – В-клітинну лімфому з малих лімфоцитів (В-ЛМЛ), у однієї пацієнтки – Т-клітинну ЛМЛ. Групами спостереження були: загальна група пацієнтів із ЛПН (n = 40), група первинних хворих, яким вперше був установлений діагноз В-ХЛЛ/ЛМЛ (n = 16), та група пацієнтів після попередньої ХТ за певною схемою. Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб. Усім пацієнтам визначали наступні коагулологічні показники: протромбіновий час (ПЧ) із підрахунком протромбінового індексу (ПІ), час рекальцифікації (ЧР), вміст фібриногену (Ф), активований парціальний тромбoplastиновий час (АПТЧ), час еуглобулінового лізису

згортка (ЧЕЛЗ), кількість тромбоцитів (Tr) та їхню агрегацію при активації аденозиндифосфоруною кислотою (АДФ) і ристоцетином.

Результати. Аналіз отриманих даних показав, що у 80,0% ($n = 32$) пацієнтів із ЛПН спостерігали порушення показників системи гемостазу у широких межах (від ознак гіпокоагуляції до схильності до тромбоутворення). Хоча достовірної різниці між групами первинних хворих і пацієнтами після попередньої ХТ не виявлено, проте більш широкі коливання коагулологічних показників спостерігали у групі первинних хворих на ЛПН. Також відмічено вплив попередньої ХТ на деякі досліджувані показники (зокрема, ЧР, ПІ).

Висновок. Дослідження показників системи гемостазу у хворих на ЛПН показало наявність порушень як з боку плазматичного ланцюга, так і тромбоцитарної складової процесу згортання крові у переважній більшості пацієнтів, що потребує від клініцистів підвищеної уваги для своєчасного попередження ускладнень з боку системи гемостазу на етапах проведення ХТ.

Ключові слова: хворі на лімфопроліферативні новоутворення, показники системи гемостазу.

INDICATORS OF HEMOSTASIS SYSTEM IN PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

S.Yu. Sergutina, S.V. Burnayeva, S.O. Sivkovich

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. Aim. To estimate coagulological potential of blood in patients with lymphoproliferative neoplasms (LPN) at different stages of chemotherapy (CT).

Materials and methods. The study was conducted on 40 patients with LPN, of which 20 were diagnosed with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), 19 – B-cell small lymphocytic lymphoma (B-SLL), in one patient – T-cell SLL. The follow-up groups consisted of: a general group of patients with LPN ($n = 40$), a group of primary patients who first diagnosed B-CLL / SLL ($n = 16$), and a group of patients after the previous CT according to a certain pattern. The control group consisted of 20 practically healthy persons. The following coagulometric parameters were determined for all patients: prothrombin time (PT) with prothrombin index (PI) count, recalcification time (RT), fibrinogen content (F), activated partial thromboplastin time (APTT), euglobulin clot lysis time (ECLT), platelet count (Tr) and their aggregation in the activation of adenosine diphosphate (ADP) and ristocetin.

Results. The analysis of the data showed that in 80,0% ($n = 32$) of patients with LPN, violations of the parameters of the hemostasis system in wide limits (from signs of hypocoagulation to predisposition to thrombotic formation) were observed. Although there was no significant difference between the groups of primary patients and patients after the previous CT, however, wider fluctuations of coagulation parameters were observed in the group of primary patients with LDL. Also, the influence of the previous CT on some of the studied indicators (in particular, RT, PI) was noted.

Conclusion. The study of hemostatic system indices in patients with LPN showed disturbances both from the plasma chain and the platelet component of the process of blood coagulation in the vast majority of patients, requiring high-level attention from clinicians to timely prevent complications from the hemostasis system at the stages of CT.

Key words: patients with lymphoproliferative neoplasms, indicators of hemostasis system.

Вступ. За даними наукової літератури, близько 50% хворих на злоякісні неоплазії мають ініціальну патологію системи гемостазу, а при прогресуванні

процесу ця цифра збільшується до 90-100% [1-3]. Патологічні порушення в системі гемостазу при захворюваннях кровотворної та лімфоїдної тканин є частими, різноманітними за генезом і проявами: від системної кровоточивості (у т. ч. з тяжкими крововиливами у мозок і профузними шлунково-кишковими кровотечами) до синдрому внутрішньосудинного згортання крові (ДВЗ-синдрому), тромботичної тромбоцитопенічної пурпури, тромбозів артерій і вен з ішеміями та інфарктами органів, а при трансплантаціях кісткового мозку – можливий розвиток венооклюзивної хвороби [4].

Взаємозв'язок між порушеннями системи гемостазу й онкологічними захворюваннями відомий уже більше 190 років. Уперше французький лікар J.-В. Bouillaud ще в 1823 р. опублікував дані щодо зв'язку між неоплазією і тромбозом. Пізніше, в 1865 р., його співвітчизником, відомим французьким лікарем А. Trousseau у своїй лекції «Phlegmasia Alba Dolens» було вперше описано випадки поєднання мігруючого тромбофлебиту поверхневих вен, що погано піддавався лікуванню, зі злякисною неоплазією [3, 5]. Ці наукові праці стали поштовхом для подальшого більш глибокого вивчення проблем порушень системи гемостазу при онкологічних захворюваннях. Так, у 1951 р. були опубліковані результати першого ретроспективного дослідження R. Askerman та J. Estes, які показали значення тромбоемболічного синдрому для виявлення прихованої пухлини: новоутворення було виявлено у 9% випадках спостережень [5]. Починаючи з 1980-х років проведено багато досліджень, що підтверджують зв'язок між тромбозами і неоплазіями [6-11]. Показано, що серед хворих з підозрою на тромбоз глибоких вен (ТГВ) або тромбоемболію легеневої артерії (ТЕЛА) злякисні новоутворення частіше виявляються в тих, у кого діагноз тромбоемболічного захворювання підтверджений [1, 7-10]. Крім того, у хворих із установленим діагнозом злякисного новоутворення тромбоемболічні ускладнення можливі на будь-якій стадії патологічного процесу. Встановлено, що онкологічне захворювання збільшує ризик

виникнення ТГВ і ТЕЛА в 6 разів [12]. У свою чергу, тромботичні ускладнення (ТУ) є другою за частотою причиною смерті онкологічних хворих [5, 7, 10, 13].

Патогенетичні механізми, що обумовлюють розвиток ТУ у хворих на злоякісні новоутворення, містять комплекс взаємодій між пухлинною клітиною, хворим і системою гемостазу. Основні причини внутрішньосудинного тромбоутворення – це пошкодження судинної стінки, підвищена схильність крові до згортання й уповільнення швидкості кровотоку – це так звана *тріада Р. Вірхова*. Із цієї тріади елементів саме *гіперкоагуляція*, що індукована пухлинними клітинами, є найвагомим і визначальним фактором внутрішньосудинного тромбоутворення в онкологічних хворих [5, 11, 12]. Висока чутливість ендотелію судин до біологічно активних речовин – лейкоцитарних протеаз, цитокінів, фактора некрозу пухлини, бактеріальних і вірусних ендотоксинів та ін.; порушення реологічних властивостей крові, неповноцінність тромбоцитарної (тромбоцитопенія і тромбоцитопатія) і плазмової ланок, пригнічення фібринолізу – все це призводить до вищенаведених тяжких тромбогеморагічних ускладнень основного захворювання у гематологічних хворих із новоутвореннями.

У пацієнтів із лімфопроліферативними новоутвореннями (ЛПН) дослідження порушень системи гемостазу майже не проводились, але ці хворі відносяться до групи високого ризику виникнення ТУ. За даними Н.С. Кwaan та співавт. частота ТУ у пацієнтів із лімфомами коливається у межах від 3 до 13% при системних формах хвороби, при первинному розташуванні патологічного процесу у головному мозку може досягати 59,5% [14]. Вивчення коагулологічних показників у хворих на ЛПН є важливим з позиції можливих ускладнень через розвиток гіперв'язкості на тлі гіперлімфоцитозу, гіперкоагуляційного синдрому, обумовленого активністю злоякісної неоплазії, або ДВЗ-синдрому, що може бути ускладненням проведення цитостатичної хіміотерапії (ХТ). Крім того, серед пацієнтів із ЛПН переважна більшість хворих є особами старшого або похилого віку, які в анамнезі мають ряд

супутньої патології (захворювання серцево-судинної системи, цукровий діабет та ін.), що також сприяє порушенням з боку системи гемостазу [15].

Мета. Оцінити коагулологічний потенціал крові у хворих на ЛПН на різних етапах ХТ.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 40 хворих на ЛПН віком від 25 до 79 років, медіана (Ме (25; 75)) – 65,5 (58,5; 70,5) років). Характеристика дослідних пацієнтів наведена у табл. 1. Групи спостереження хворих на ЛПН були наступними: загальна група пацієнтів (n = 40); група первинних хворих, яким вперше був установлений діагноз В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії/ лімфоми з малих лімфоцитів (В-ХЛЛ/ ЛМЛ; n = 16), та група пацієнтів, що отримували попередньо ХТ за різними схемами, але були взяті в дослідну групу після перерви в лікуванні, перед початком чергового курсу ХТ за певною схемою (n = 24). Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб (10 жінок і 10 чоловіків) віком від 23 до 54 років.

Таблиця 1 – Характеристика хворих на лімфопроліферативні новоутворення, що відібрані для дослідження

№ з/п	Показник	Кількість спостережень, абс. (%); середні дані (M ± m; Me (min; max))
1	Хворі на ЛПН із діагнозом: - В-ХЛЛ - В-клітинна ЛМЛ - Т-клітинна ЛМЛ	20 (50,0) 19 (47,5) 1 (2,5)
2	Стать: - чоловіки - жінки	19 (47,5) 21 (52,5)
3	Вік хворих	62,3 ± 1,9; 65,5 (25,0; 79,0)
4	Первинні хворі	16 (40,0)
5	Хворі після певного курсу ХТ	24 (60,0)

Усім пацієнтам визначали наступні коагулологічні показники: протромбіновий час (ПЧ) із підрахунком протромбінового індексу (ПІ), час рекальцифікації (ЧР), вміст фібриногену (Ф), активований парціальний

тромбопластиновий час (АПТЧ), час еуглобулінового лізису згортка (ЧЕЛЗ), кількість тромбоцитів (Тр) та їхню агрегацію при активації аденозиндифосфоруною кислотою (АДФ) і ристоцетином.

Для проведення досліджень використовували комерційні тест-набори фірми «Helena В.Е.» (Велика Британія). Кількість Тр у периферичній крові визначали за допомогою гематологічного аналізатора фірми Sysmex КХ-21 N (Японія). Агрегацію Тр досліджували за допомогою агрегометра «Тром-Лайт» (Польща). Статистичну обробку отриманих результатів проведено з використанням пакету статистичних програм Statistica 6.1 шляхом підрахування середньої арифметичної та її похибки ($M \pm m$), міри центральної тенденції – медіани (Me), – і міри дисперсії у межах 25 та 75 перцентилей ($Me(25; 75)$). Порівняння показників між дослідними групами здійснювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Отримані результати досліджень наведені у табл. 2. Аналіз отриманих даних показав, що у 80,0% ($n = 32$) пацієнтів із ЛПН спостерігали порушення показників системи гемостазу у широких межах (від ознак гіпокоагуляції до схильності до тромбоутворення), хоча достовірної різниці між групами первинних хворих і пацієнтами після попередньої ХТ не виявлено. Так, значення АПТЧ коливалось від 24 до 42 с ($Me - 31,0 (26,5; 34,0)$ с), у середньому цей показник складав $(30,8 \pm 0,9)$ с, що не виходило за межі коливань нормальних значень АПТЧ (27-32 с). При порівняльному аналізі даний показник у первинних пацієнтів із ЛПН коливався у більш широкому діапазоні ($Me - 32,0 (26,0; 36,0)$ с), ніж у хворих після попередньої ХТ ($Me - 29,5 (28,0; 32,0)$ с).

Результати досліджень ПІ та ЧР у всіх дослідних групах показали, що середні значення цих показників знаходились у межах нормальних значень (табл. 2). Проте, більш вираженими їхні коливання були в групі пацієнтів після попередньої ХТ, що свідчить про вплив цитостатичної терапії на систему гемостазу і можливі ускладнення під час її проведення.

Визначення вмісту фібриногену – одного з найважливіших факторів плазмової ланки системи гемостазу, – показало коливання даного показника в широкому діапазоні значень – від 1,3 до 4,2 г/л (Me – 2,3 (1,75; 2,8) г/л); у середньому його величина не виходила за межі нормальних значень у всіх дослідних групах (табл. 2).

Таблиця 2 – Показники системи гемостазу у хворих на лімфопроліферативні новоутворення*

Група спостереження	Показник				
	АПТЧ, с	ЧР, с	ПІ, %	Ф, г/л	ЧЕЛЗ, хв
Загальна група хворих на ЛПН, М ± m; Me (min; max)/ (25; 75)	30,8 ± 0,8 31 (23; 42)/ (26,5; 34)	73,3 ± 2,1 70 (54; 110)/ (62; 80)	95,7 ± 1,6 100 (58; 112)/ (90; 100)	2,34 ± 0,12 2,3 (1,3; 4,2)/ (1,75; 2,8)	193,4 ± 11,5 180 (60; 400)/ (150; 240)
Первинні хворі на ЛПН, М ± m; Me (min; max)/ (25; 75)	31,8 ± 1,6 32 (23; 42)/ (26; 36)	69,9 ± 2,2 68 (58; 92)/ (63,5; 75)	97,7 ± 1,4 100 (90; 106)/ (92,5; 100)	2,23 ± 0,21 2,0 (1,3; 4,0)/ (1,55; 2,7)	200,9 ± 18,8 202,5 (60; 330)/ (157,5; 240)
Хворі на ЛПН після курсу ХТ, М ± m; Me (min; max)/ (25; 75)	29,9 ± 0,9 29,5 (24; 36)/ (28; 32)	75,7 ± 3,2 73 (54; 110)/ (62; 87)	94,3 ± 2,6 97,5 (58; 112)/ (90; 100)	2,42 ± 0,15 2,4 (1,4; 4,2)/ (1,9; 2,8)	188,3 ± 14,8 167,5 (90; 400)/ (142,5; 225)
Група здорових осіб, М ± m; Me (min; max)/ (25; 75)	31,2 ± 0,5 29,5 (27; 33)/ (28; 31)	87,4 ± 2,6 83 (68; 118)/ (72; 103)	95,4 ± 1,6 96,8 (88; 100)/ (90; 100)	2,72 ± 0,21 2,8 (2,0; 3,8)/ (2,4; 3,0)	216,5 ± 6,7 217,5 (105; 240)/ (167,5; 210)
Межі нормальних коливань показника**	27-32	60-120	90-110	2,0-4,0	120-240

Продовження табл. 2.

Група спостереження	Показник			
	АДФ-інд. агрегація, %	Ристоміцин-інд. агрегація, %	Тр, × 10 ⁹ /л	Етаноловий тест, (-)/ (+)
Загальна група хворих на ЛПН, М ± m; Ме (min; max)/ (25; 75)	36,93 ± 2,62 35,4 (12,6; 80,4)/ (31,6; 41,5)	33,95 ± 2,76 32,0 (5,6; 77,9)/ (25,2; 41,2)	189,9 ± 14,3 168 (70; 524)/ (125; 230)	(+) – 8 (20,0%), (-) – 32 (80,0%)
Первинні хворі на ЛПН, М ± m; Ме (min; max)/ (25; 75)	35,99 ± 3,71 36,8 (12,6; 68,5)/ (26,5; 41,5)	31,78 ± 3,71 32,0 (5,6; 56,0)/ (24,5; 41,2)	219,5 ± 30,6 194 (70; 524)/ (144; 292)	(+) – 2 (12,5%), (-) – 14 (87,5%)
Хворі на ЛПН після курсу ХТ, М ± m; Ме (min; max)/ (25; 75)	37,95 ± 3,83 34,8 (17,2; 80,4)/ (31,6; 41,2)	36,45 ± 4,18 32,4 (22,7; 77,9)/ (28,2; 38,9)	171,4 ± 12,3 167,5 (88; 297)/ (124; 217)	(+) – 6 (25,0%), (-) – 18 (75,0%)
Група здорових осіб, М ± m; Ме (min; max)/ (25; 75)	50,3 ± 1,6 51,2 (38,9; 59,7)/ (44,2; 53,5)	48,1 ± 1,6 45,3 (32,7; 56,4)/ (43,8; 51,6)	250,9 ± 13,9 236 (183; 312)/ (204; 285)	(-) – 20 (100,0%)
Межі нормальних коливань показника**	40-60	35-55	150-350	(-)

Примітки:

1. * – Достовірної різниці між групами первинних хворих на ЛПН і пацієнтів після курсів ХТ за коагулологічними показниками не виявлено (p > 0,05).
2. ** – Межі нормальних коливань показників наведені за [16, 17].

Показником, що характеризує фібринолітичну активність плазми крові, є ЧЕЛЗ. Дані, отримані при дослідженні даного показника у пацієнтів із ЛПН, показали, що у переважної більшості (72,5%) хворих фібринолітична функція крові була збережена. У семи (17,5%) випадках спостерігали подовження ЧЕЛЗ, що свідчить про зниження фібринолітичної активності крові; у чотирьох

пацієнтів (10,0%) було слабке утворення згортка і його швидкий лізис (гіперфібриноліз). У середньому цей показник у всіх дослідних групах хворих був у межах нормальних значень (табл. 2). Проте більш широкий діапазон коливання ЧЕЛЗ спостерігали в групі первинних хворих (Me – 202,5 (157,5; 240) хв) у порівнянні з хворими після ХТ (Me – 167,5 (142,5; 225) хв).

Дослідженнями тромбоцитарної ланки гемостазу у хворих на ЛПН було виявлено, що у більшості пацієнтів (75,0%) кількість Тр знаходилась у межах нормальних значень $(189,9 \pm 14,3) \times 10^9/\text{л}$; Me – 168 (125; 230) $\times 10^9/\text{л}$. Навпаки, функціональна активність Тр у 64,0 % хворих була порушена, що підтверджувалось зменшенням або збільшенням їхніх агрегаційних властивостей. Як видно із наведених у табл. 2 результатів досліджень, індукована агрегація Тр у хворих на ЛПН у середньому була нижчою за нормальні значення як до АДФ $((36,9 \pm 2,6) \%)$, так і до ристоцетину $((33,9 \pm 2,8) \%)$. Проте, діапазон цих показників був більш широким у групі первинних хворих.

Висновок

Дослідження показників системи гемостазу у хворих на ЛПН показало порушення у більшості пацієнтів як з боку плазмового ланцюга, так і тромбоцитарної складової процесу згортання крові у широких межах: від ознак гіпокоагуляції до схильності до тромбоутворення, що потребує від клініцистів підвищеної уваги для своєчасного попередження ускладнень з боку системи гемостазу на етапах проведення ХТ.

Література

1. Lyman G.H. Venous thromboembolism in the patient with cancer: focus on burden of disease and benefits of thromboprophylaxis [Електронний ресурс] / G.H. Lyman / Cancer. – 2011. – Vol. 117, №7. – P. 1334-1349. – Режим доступу : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3780385/>

2. Дубініна В.Г. Порухення ланок системи регуляції агрегатного стану крові в онкологічних хворих / В.Г. Дубініна, О.В. Туренко, Д.Г. Гавриченко // Клін. анестезіологія та інтенсивна терапія. – 2013. – № 1. – С. 89-98.

3. Elyamany G. Cancer-Associated Thrombosis: An Overview [Електронний ресурс] / G. Elyamany, A.M. Alzahrani, E. Bukhary // Clin. Med. Insights. Oncol. – 2014. – Vol. 8. – P. 129-137. – Режим доступу : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259501/>

4. Руководство по гематологии : в 3 т. Т. 3 / Под ред. А.И. Воробьева. – [3-е изд., перераб. и дополн.]. – М. : Ньюдиамед, 2005. – 416 с. (С.129-132).

5. Состояние системы гемостаза у больных со злокачественными новообразованиями / О.В. Соменова, А.В. Маджуга, А.Л. Елизарова, Г. Н. Зубрихина // Клин. онкогематология. – 2008. – Т. 1, №3. – С. 266-272.

6. Brose K.M.J. Cancer-associated thrombosis: prevention and treatment [Електронний ресурс] / K.M.J. Brose, A.Y.Y. Lee // Curr. Oncol. – 2008. – Vol. 15 (suppl. 1). – S. 58-67. – Режим доступу : <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Admin/Мои%20документы/211-1282-1-PB.pdf>

7. Horowitz N. Thrombophilia and cancer [Електронний ресурс] / Horowitz N., Brenner B. // Pathophysiol. Haemost. Thromb. – 2008. – Vol. 36, №3-4. – P. 131-136. – Режим доступу : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176986>

8. Wun T. Venous thromboembolism (VTE) in patients with cancer: epidemiology and risk factors [Електронний ресурс] / Wun T., White R.H. // Cancer Invest. – 2009. – Vol. 27 (suppl. 1). – P. 63-74. – Режим доступу : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291526>

9. Falanga A. The Cancer-Thrombosis Connection [Електронний ресурс] / A. Falanga // Hematologist. – 2011. – Vol. 8, №4. – Режим доступу : <http://www.hematology.org/Thehematologist/Mini-Review/1244.aspx>

10. Incidence of venous thromboembolism in patients with cancer – a cohort study using linked United Kingdom databases [Електронний ресурс] / Walker A.J., Card T.R., West J. [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2013. – Vol. 49, №6. – P. 1404-141. – Режим доступу : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23146958>.

11. Тарабрин О.А. Нарушение системы гемостаза у онкологических больных / О.А. Тарабрин, А.И. Мазуренко // Онкогинекология. – 2015. – №3. – С.48-56.

12. Levine M.N. Thrombosis and cancer / Levine M. N., Lee A.Y., Kakkar E. K. // Am. Society of Clinical Oncology, 41st Annual Meeting (Orlando, Florida, USA, 2005, May 13-17). – P. 748-757.

13. Soff G.A. Pathophysiology and management of thrombosis in cancer: 150 years of progress [Електронний ресурс] / Soff G.A. // J. Thromb. Thrombolysis. – 2013. – Vol. 35, №3. – P. 346-351. – Режим доступу : <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11239-013-0897-9>

14. Kwaan H.C. Incidence and pathogenesis of thrombosis in hematologic malignancies [Електронний ресурс] / H.C. Kwaan, B. Vicuna // Semin. Thromb. Hemost. – 2007. – Vol. 33, № 4. – P. 303-312. – Режим доступу : <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2007-976164>

15. Особенности состояния системы гемостаза у больных старшего и пожилого возраста, страдающих злокачественными лимфомами [Електронний ресурс] / С.И. Сафиуллина, А.Р. Ахмадеев, О.Н. Сигитова [и др.] // Мед. практика. – Режим доступу : <http://mfvt.ru/osobennosti-sostoyaniya-sistemy-gemostaza-u-bolnyx-starshego-i-pozhilogo-vozrasta-stradayushhix-zlokachestvennymi-limfomami/>

16. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. [и др.]. – Томск : Изд-е Томского университета, 1980. – 314 с.

17. Долгов В.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / Долгов В.В., Свирин П.В. – М.-Тверь : ООО «Издательство «Триада», 2005. – 227 с.

Надійшла 01.10.2017 року.

УДК 616.155.191 – 021.3 + 615.275

ПРОЗАПАЛЬНІ ТА ПРОАГІОГЕННИЙ ЦИТОКІНИ У ХВОРИХ НА СПРАВЖНЮ ПОЛІЦИТЕМІЮ РІЗНОГО ПРОФІЛЮ РИЗИКУ

М. І. Сімонова, О. Й. Даниш, Х. Р. Сусіда, З. В. Масляк

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Резюме. У статті наведено результати дослідження концентрації *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *VEGF* у 34 пацієнтів із справжньою поліцитемією. Хворих було розподілено на дві групи – низького та високого ризику відповідно до клінічних та лабораторних критеріїв. Аналіз даних дослідження свідчить, що у пацієнтів з групи високого ризику концентрації *VEGF*, *TNF- α* і *IL-8* були вищими, що свідчить про їх важливу роль у розвитку тромботичних ускладнень. Встановлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем тромбоцитів та концентрацією *VEGF*, *TNF- α* , *IL-6* та *IL-8*, а також між кількістю лейкоцитів та рівнем *IL-6*.

Ключові слова: справжня поліцитемія, цитокіни, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *VEGF*.

PROINFLAMMATORY AND PROAIGIOGENIC CYTOKINS IN DIFFERENT RISK GROUP OF PATIENTS WITH POLYCYTHEMIA VERA

M. Simonova, O. Danysh, Ch. Susida, Z. Maslyak

SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine", Lviv

Summary. The study presents results of analysis of the levels of *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8* and *VEGF* in 34 patients with polycythemia vera. Patients were distributed into low-risk and high-risk groups according to clinical and laboratory criteria. Obtained results show that patients in high risk group had higher levels of *VEGF*, *TNF- α* and *IL-8*, that gives possibility to suggest important role of the latter in thrombotic complications. Direct correlation between the level of platelets and concentration of *VEGF*, *TNF- α* , *IL-6* and *IL-8*, and between the level of leukocytes and *IL-6* was revealed.

Key words: polycythemia vera, cytokins, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *VEGF*.

Вступ. Хронічні мієлопроліферативні неоплазії (ХМПН) – група захворювань кісткового мозку, що характеризуються клональними порушеннями гемопоезу. Відповідно до класифікації ВООЗ 2008 року до них належать вісім підкатегорій, найбільш частими з яких є: справжня поліцитемія (СП), есенціальна тромбоцитемія (ЕТ), первинний мієлофіброз (ПМФ), хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ). Згідно останніх досліджень етіологічними чинниками, які запускають патологічний процес при ХМПН, є мутації певних відомих генів. При *BCR-ABL*-негативних ХМПН, зокрема у понад 90% хворих з ідіопатичним мієлофіброзом (МФ) й есенціальною тромбоцитемією та у всіх

хворих на справжню поліцитемію, захворювання характеризується пошкодженням одного з трьох основних генів: *JAK2*, *CALR* і *MPL* [1, 5]. Однією з ланок гемопоезу, на які можуть впливати мутовані гени при ХМПН, є цитокіни. Цей факт доведений для мієлофіброзу і стосується фактора некрозу пухлини, фактора росту ендотеліоцитів, інтерлейкінів 6 та 8 [4].]. Tefferi і співавтори [7, 8] також вважають, що IL-8, IL2R, IL-12, IL-15 є незалежними прогностичними факторами зниження якості життя хворих на ПМФ, оскільки мають відношення до розвитку тромботичних ускладнень. При СП досить добре досліджена патогенетична роль еритропоєтину, визначення рівня якого використовується як один з критеріїв диференційної діагностики хвороби зі симптоматичними еритроцитозами. Також встановлено, що окремі прозапальні цитокіни необхідні для росту *JAK2V617F* мутованих еритроїдних колоній [2, 3, 9]. Разом з тим, при СП та ЕТ патогенетична роль цитокінів, особливо у їх зв'язку з мутаціями таргетних генів, практично не досліджена [10, 11]. Найбільш помітною є робота E. Rousselot зі співавторами [6], в якій у 38 пацієнтів з ЕТ і СП описано залежність окремих цитокінів від мутаційного статусу хворих, однак самі автори вказують на необхідність розширених досліджень в цьому напрямі.

Мета дослідження. Встановлення взаємозв'язків між окремими прозапальними та проангіогенним цитокінами з профілем ризику у хворих на СП.

Матеріали та методи. Дослідження проведено в 34 хворих на СП. У 27 пацієнтів діагноз підтверджено відповідно до критеріїв ВООЗ 2008, у 4 хворих СП діагностували за критеріями робочої групи з дослідження поліцитемії (PVSG 2005), ще у 3 пацієнтів з тривалістю процесу 14 – 20 років встановлений раніше діагноз підтверджено в рамках дослідження на основі виявлення у них мутації гена *JAK2*. Медіана віку хворих на час діагностування СП становила 58 (37 – 76) років, причому 5 пацієнтів були молодшими за 50 років. На час

включення хворих в обстеження середня тривалість СП становила 3 роки, коливаючись від 6 міс. до 20 років.

Дослідження проводилося в заморожених зразках плазми крові для уникнення спотворення результатів внаслідок коливання рівня тромбоцитів. Контролем була плазма 6 здорових осіб. Дослідження концентрації TNF- α , IL-6, IL-8, VEGF проводили за допомогою стандартних наборів: "VEGF людини" (BIOSOURCE, Бельгія), "Фактор некрозу пухлин альфа" (Вектор Бест, Новосибірськ), «Інтерлейкін-8 ІФА – Бест» (Вектор Бест, Новосибірськ) та «Інтерлейкін -6 ІФА – Бест» (Вектор Бест, Новосибірськ). Результати зчитували на планшетному фотометрі Multiskan EX із подальшим математичним аналізом.

Результати та їх обговорення. Відповідно до клінічних та лабораторних критеріїв усіх хворих було розподілено на групи ризику: низького – 15 хворих та високого – 19 пацієнтів. Високий ризик встановлено у 4 пацієнтів віком <60 років з тромботичними ускладненнями, для решти 15 хворих фактором високого ризику був вік понад 60 років, з яких у 4 також розвинулись тромботичні ускладнення.

Аналіз гематологічних показників залежно від профілю ризику показав, що медіани показників гемоглобіну, еритроцитів, гематокриту та тромбоцитів у хворих високого та низького ризику суттєво не відрізнялись між собою, результати представлені в табл. 1. Єдиним показником, вищим у хворих високого ризику, був рівень лейкоцитів, однак через значні коливання ця різниця не була достовірною.

Таблиця 1 – Показники гемограми у хворих на СП високого та низького профілю ризику

Показники	Групи високого ризику		Група низького ризику	
	М (min-max)	0,25–0,75 квартилі	М (min-max)	0,25–0,75 квантилі
Гемоглобін, г/л	179	165,5 - 193	168	164,2 – 192,2

	(158 – 214)		(160 – 258)	
Еритроцити, Т/л	6,40 (4,63 – 8,96)	5,49 -7,86	6,54 (5,24 – 9,80)	5,6 – 7,3
Гематокрит, л/л	0,55 (0,47 – 0,64)	0,52 – 0,59	0,49 (0,43-0,62)	0,47 – 0,53
Лейкоцити, Г/л	14,75 (8,70 – 22,80)	12,0 – 16,35	8,70 (6,40 – 23,3)	8,0 – 14,8
Тромбоцити, Г/л	480 (285-876)	454,0 – 656,5	414 (232 – 816)	269,7 – 525,2

Відсутність достовірної різниці між двома підгрупами пацієнтів за показниками загального аналізу крові свідчить про те, що при СП гематологічні показники не є однозначним фактором ризику тромботичних ускладнень, а, найімовірніше, має значення пошкодження інших ланок гомеостазу, яке з віком набуває все більшого впливу.

При дослідженні цитокінового профілю плазми крові у всіх груп хворих на СП спостерігали статистично значиму різницю між концентрацією VEGF, TNF- α , IL-6 та IL-8 порівняно зі здоровими особами, в той же час досліджувані показники в окремих пацієнтів коливались у широкому діапазоні (табл. 2). Встановлено суттєве підвищення проангіогенного VEGF та прозапального IL-8 інтерлейкіну у всій групі хворих на СП: медіана VEGF при цьому захворюванні була майже в 2,5 рази вищою порівняно з контрольною групою. Концентрація TNF- α у хворих на СП була, навпаки, меншою вдвічі порівняно зі здоровими, хоча також спостерігались значні коливання окремих показників в межах (4,47 – 86,69) пг/мл.

Таблиця 2 – Концентрація прозапальних та ангіогенного цитокінів у хворих на СП

Показники	Донори			Хворі на СП		
	Медіана	Min - max	0,25 - 0,75 квартилі	Медіана	Min - max	0,25 - 0,75 квартилі
VEGF, пг/мл	39,84	16,54 130,18	17,29 71,99	92,39	32,40 937,16	75,42 248,70
TNF- α , пг/мл	21,21	7,44 31,05	15,62 30,68	10,96	4,47 86,69	6,86 36,54
IL-6, пг/мл	4,67	3,81 5,88	4,14 5,78	5,70	3,07 11,88	4,32 7,61
IL-8, пг/мл	4,92	3,87 5,68	4,54 5,38	14,94	3,42 87,30	5,0 71,56

Суттєво не відрізнявся від контролю рівень інтерлейкіна-6 при незначних відхиленнях показників окремих осіб (табл. 3). Медіана IL-8 була втричі більшою від показника у здорових. Разом з тим, аналіз рівня досліджуваних цитокінів у хворих високого і низького ризику показав, що між ними існує суттєва різниця стосовно концентрації VEGF, TNF- α та IL-8, але не IL-6 (табл. 3).

Таблиця 3 – Концентрація прозапальних та ангіогенного цитокінів у хворих на СП низького та високого профілю ризику

Показники	Високий ризик			Низький ризик		
	Медіана	Min - max	0,25 - 0,75 квартилі	Медіана	Min - max	0,25 - 0,75 квартилі
VEGF, пг/мл	132,05	32,40 937,16	87,76 - 599,02	76,76	34,22 169,51	64,12 - 146,99
TNF- α , пг/мл	15,81	4,47 86,69	10,71 - 41,37	7,61	4,47 67,37	5,70 - 52,81
IL-6, пг/мл	5,70	3,07 11,88	4,49 - 8,51	5,94	3,81 7,62	4,16 - 7,62
IL-8, пг/мл	14,94	3,42 87,30	5,00 - 71,56	6,06	3,27 8,95	3,61 - 8,83

Так, медіани концентрації перших трьох цитокінів були в 1,7 – 2 рази вищими у пацієнтів високого ризику і становили відповідно (132,05; 15,81; 14,94) пг/мл проти (76,76; 7,61; 6,06) пг/мл у хворих низького ризику. Суттєвої різниці в концентрації IL-6 між хворими різного профілю ризику не встановлено. Аналіз рівня VEGF у окремих пацієнтів високого ризику показав, що дуже високі

показники (більше від медіани в 3,5 і 7 разів) встановлено у двох пацієнтів, причому хвора з найвищим показником за 4 міс. до обстеження перенесла інфаркт міокарда. У цих же хворих рівень інших цитокінів суттєво не відрізнявся від показників цілої підгрупи.

Проведено дослідження кореляційного зв'язку між окремими цитокінами та лабораторними показниками, оскільки тісна позитивна кореляція ($r > 0,5$) свідчить про прямий взаємозв'язок між змінами окремих цитокінів та визначених біологічних параметрів. Тісний позитивний взаємозв'язок встановлено між концентрацією в плазмі VEGF і рівнем тромбоцитів ($r = 0,78$). Помірний прямий кореляційний зв'язок встановлено між TNF- α і рівнем тромбоцитів. Тісний кореляційний зв'язок встановлено між концентрацією IL-6 та рівнями лейкоцитів і тромбоцитів (відповідно $r = 0,72$ та $r = 0,97$). Помірний прямий кореляційний зв'язок встановлено між концентрацією IL-8 та рівнем тромбоцитів. Встановлені кореляційні зв'язки підтверджують версію щодо впливу прозапальних та проангіогенного цитокінів на проліферативну активність окремих паростків гемопоезу.

Висновки

У хворих на СП встановлено зміни продукції ключових прозапальних цитокінів TNF- α , IL-6, IL-8, та проангіогенного VEGF в порівнянні з контрольною групою. Аналіз цих показників залежно від групи ризику показав, що у пацієнтів з високим профілем ризику концентрації VEGF, TNF- α і IL-8 були вищими, що свідчить про їх важливу роль у розвитку тромботичних ускладнень. Встановлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем тромбоцитів та концентрацією VEGF, TNF- α , IL-6 та IL-8, а також між кількістю лейкоцитів та рівнем IL-6. Отримані результати співзвучні з даними закордонних авторів і свідчать про роль прозапальних та проангіогенного цитокінів в перебігу СП, а також вказують на можливість використання їх з прогностичною метою.

До прогностичних маркерів, здатних адекватно відображати ризик прогресії хвороби, а також чіткіше окреслити групу високого ризику,

відносяться проангіогенний регуляторний фактор VEGF та прозапальний цитокін IL-8. З часом, отримані результати можуть бути підставою для розробки заходів з профілактики тромбозів у хворих на СП.

Література

1. Соколова М. А. Современные представления о «классических» Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях / Соколова М.А. // Клиническая онкогематология. – 2010. – Т. 3., №3. – С. 235-242.

2. Boiocchi L. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms / L. Boiocchi, C. Vener, F. Savi [et al.] // J Clin Pathol. – 2011. – V.64. – P. 226-231.

3. Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F / M. Boissinot, C. Cleyrat, M. Vilaine [et al.] // Oncogene. – 2011. – V.30. – P. 990-1001.

4. Kvasnicka H. M. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders / H. M. Kvasnicka, J. Tiele // Histol.Histopatol. – 2004. – V19, N4. – 1245-1260.

5. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms/ P. Lundberg, A. Karow, R. Nienhold [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 123, №14. – P. 2220-2228.

6. Cytokine profiles in Polycythemia vera and Essential Thrombocythemia patients: clinical implications/E. Pourcelot, C. Trocme, J. Mondet [et al.] // Exp.Hemathol. – 2014. – V42, N5. – P. 360-368.

7. Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms / A. Tefferi, J.W. Vardiman // Leukemia. – 2008. – V.22. – P.14-22.

8. Tefferi A. How I treat myelofibrosis / A. Tefferi // Blood. – 2011. - 117(13). – P. 3494-3504.

9. Circulating endothelial cells in essential thrombocythemia and polycythemia vera: correlation with JAK2-V617F mutational status, angiogenic factors and coagulation activation markers / J. Trelinski, A. Wierzbowska, A. Krawczyńska [et al.] // International Journal of Hematology. – 2010. – №6. – P.792-798.

10. Circulating IL2R, IL-8, IL15 and CXCL10 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis a comprehensive cytokine profiling study/ Vaidya N., Caramazza P., Finke C. [et al] //ASH Ann. Meeting Abstracts/ Blood – 2010. – V.116,N21. – Abst. 3068.

11. Plasma cytokines in polycythemia vera: Phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis / R. Vaidya, N. Gangat, T. Jimma et al. // American Journal of Hematology. – 2012. – №11. – P. 1003–1005.

Надійшла 09.11.2017 року

УДК 616-08-035

ІНФУЗІЙНА ТЕРАПІЯ ПРИ КРИТИЧНИХ СТАНАХ

А. В.Старіков, Л. В.Баронська

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. В статті розглянуті питання щодо диференційованого застосування інфузійних розчинів різного походження в залежності від клінічного стану хворого. Наведений матеріал може бути корисним у повсякденній професійній діяльності лікарів.

Ключові слова: інфузійні розчини, стан хворого.

INFUSION TREATMENT AT CRITICAL STANDS

A. V. Staricov, L. V. Baronskaya

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. In review consider the questions of differential using the infusions solutions different action depending on clinical state of patients. Conduct results let to be us et professional occupation the physicians.

Key words: consider the questions, infusions solutions, state of patients.

Інфузійно-трансфузійна терапія є важливою складовою інтенсивних лікувальних засобів у хворих з різною патологією. Відомо, що всі критичні

стани супроводжуються розвитком ДВЗ-синдрому різного ступеня важкості, що підтверджують численні дослідження. Так, наприклад, за даними Dreus R. E. [7] у 10-20% хворих, які знаходились на лікуванні у відділеннях інтенсивної терапії, встановлено критичну тромбоцитопенію зі зниженням кількості тромбоцитів менше $50 \cdot 10^9/\text{л}$ і зростанням смертності. Сучасні кровозамінники застосовують, у першу чергу, для відновлення об'єму циркулюючої крові та покращення її реологічних і коагуляційних властивостей. Так, при використанні похідних гідроксиетилкрохмалю (HES-200/0,5) необхідно враховувати фізико-хімічні властивості їхніх складових субстанцій. Дослідження показали, що показник молекулярно-масового розподілу має важливе значення при прогнозуванні терапевтичного ефекту та можливості виникнення небажаних реакцій в умовах застосування колоїдно-осмотичних розчинів [5]. Клінічні дослідження виявили зростання смертності на 90-й день у пацієнтів із сепсисом або зростання частоти ниркової недостатності при проведенні замісної терапії у пацієнтів, які знаходились у критичному стані, включаючи пацієнтів із сепсисом, після лікування ГЕК у порівнянні з кристалоїдними розчинами [2,3,4]. Таким чином, виходячи з цих попередніх даних, інфузію ГЕК, що проводиться для лікування гіповолемії, слід зупинити одразу після досягнення нормоволемії, і якщо пацієнт не має повторної гіповолемії не слід застосовувати додаткові дози розчину ГЕК. Не рекомендовано застосування ГЕК пацієнтам із сепсисом, нирковою та печінковою недостатністю (з олігурією або анурією) або у випадку ниркової замісної терапії [2, 3, 9].

Необхідно також зупинитися на кровозамінниках з регулюючою дією на кислотно-лужний та електролітний баланс. На теперішній час, виробляється достатня кількість сольових розчинів з різним складом електролітів (розчини Рінгера, Рінгера-Локка, Рінгера Лактату, гіпертонічний розчин натрію хлориду, 5 – 10% розчини глюкози та ін.), що використовуються при критичних станах.

В експерименті було доведено, що проведення реанімації з застосуванням гіпертонічних 5,0 – 7,5% сольових розчинів супроводжується більш суттєвим зниженням внутрішньочерепного тиску, в порівнянні з застосуванням ізотонічних або слабгіпотонічних розчинів. Існуючі літературні дані свідчать про більш сприятливий перебіг захворювань, коли хворі з гіпотензією, в умовах черепно-мозкової травми, на дошпитальному етапі отримували 7,5% сольовий розчин у суміші з колоїдом або без нього [1, 6, 10]. Доцільним також буде уникати застосування розчинів, до складу яких входить глюкоза при набряку головного мозку. Це може мати суттєве значення, особливо при проведенні інфузійної терапії, де існує необхідність у проведенні постійного контролю психо-неврологічного стану хворого. Некоректне введення інфузійних розчинів може призводити до розвитку судом, набряку мозку і легень, зростання рівня калію і натрію, гіпо- і гіперглікемії. Особливе значення це має у дітей, де швидкість зростання осмоляльності сироватки крові при введенні кристалоїдів в перші 24 години не мусить перевищувати 3 осмоль/кг. Тому, в умовах поліорганної дисфункції, введення розчинів проводять під контролем осмоляльності, функції нирок, міокарду і психо-неврологічного статусу, щоб запобігти перевантаженню рідиною.

Набувають широкого застосування для детоксикаційної терапії такі препарати, як Реосорбілакт, Сорбілакт і Ксилат. Загальна осмолярність Реосорбілакту в три рази перевищує осмолярність плазми крові (0,9 проти 0,29 осмоль/л), а Сорбілакту – в 5,5 разів (1,7 осмоль/л). Завдяки таким осмотичним властивостям цих препаратів, має місце і відповідний перерозподіл рідини із міжклітинного простору до судинного русла, що сприяє покращанню мікроциркуляції й перфузії тканин в умовах проведення інтенсивної терапії. Важливе значення має присутність лактат-аніону, який впливає на кислотно-лужний баланс крові і бере участь у

реакціях вуглеводно-енергетичного обміну та функції клітин PEC, печінки і нирок. [1,9].

Ксилат – комплексний поліфункціональний інфузійний препарат. За складом він належить до багатоконпонентних гіперосмолярних розчинів, має гемодинамічні та протишовкові властивості. Гіперосмолярний ксиліт (610 мосм/л) підвищує осмотичний тиск, тому препарат використовують як «blood expander», що сприяє швидкому наповненню судинного русла та регідратації організму. Препарат призначають для зменшення інтоксикації, поліпшення мікроциркуляції, корекції кислотно-лужного балансу крові, поліпшення гемодинаміки та часткового покриття потреби у вуглеводах, що виникає при цукровому діабеті та інших порушеннях утилізації глюкози.

Головним завданням інфузійно-трансфузійної терапії в умовах геморагічного шоку є відновлення об'єму циркулюючої крові та киснево-транспортної функції. При цьому, ефективність проведення інфузійної терапії залежить від своєчасної оцінки ступеня тяжкості стану хворого та об'єму його крововтрати і особливостей дій інфузійних розчинів. Так, наприклад, основною проблемою при використанні в якості лікарських засобів, що відновлюють об'єм циркулюючої крові, на тлі декстрану є їх пролонгуюча гепариноподібна дія, що може сприяти блокуванню PEC, скороченню часу урокіназо-залежного лізису еуглобулінового згустку, що може свідчити про посилення фібринолізу. Причина цього – взаємодія молекули декстрану із фібрином і плазміном, а також їх взаємодія між собою.

Аналогічні дані наведені щодо похідних гідроксиетилкрохмалю ГЕК (рефортан та інші). У зв'язку з цим, при крововтраті на рівні 25% ОЦК та застосуванні значних об'ємів колоїдно-осмотичних розчинів, з метою запобігання коагулопатії, необхідне введення свіжозамороженої плазми в об'ємі до 1000 мл із наступним проведенням досліджень показників судинно-тромбоцитарної та коагуляційної ланок системи гемостазу [11, 12].

Таким чином, при застосування різноманітних колоїдних розчинів, при проведенні інтенсивної терапії, необхідно приділяти особливу увагу можливості розвитку небажаних ефектів, що можуть сприяти розвитку коагуляційних порушень та печінково-ниркової недостатності.

Література

1. Буланов А. Ю. Влияние различных типов коллоидных объемозамещающих растворов на измененную систему гемостаза / Буланов А. Ю., Городецкий В. М., Шулутко Е. М. // Анестезиология и реаниматология. – 2004. – №2. – С. 25-30.
2. Assessment of hemodynamic efficacy and safety of 6% hydroxyethylstarch 130/0,4 versus 0,9% NaCL fluid replacement in patients with severe sepsis. / Guidet B., Martinet O., Boulain T. [et al] // The CRYSTMAS study. Critical care (London, England). – 2012. – V. 16. – R 94.
3. Hydroxyethylstarch or salin for fluid resuscitation in intensiv care. / Myburgh J. A., Finfer S., Bellomo R. [et al] // N Engl J Med. – 2012. – № 367. – V. 20. – P. 1901-1911.
4. Hydroxyethyl Starch 130/0,4 versus Ringers Acetate in severe Sepsis. / Perner A., Haase N., Guttormsen A. B. [et al] // N Engl J Med. – 2012– № 367. – V. 2. – P. 124-134.
5. Пол Л. Марино. Интенсивная терапия. – М.: Медицина, 1998. – 639 с.
6. Gapanovich V. The rational uze of colloid and crystalloid plasma - expander solutions. Blood – sparing medicine and surgeri: the absolut need of safe autologous and homologous blood donation. Proceedings of the E ETM residential cours. / Gapanovich V. // Lviv. – 2002. – P. 25 - 27.
7. Dreus R. E. Trombocitopenic disorders in critical ill patiens. / Dreus R. E., Weinberger S. E. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – V. 162. – P. 347-351.
8. Инструкция по использованию препарата Волювен. Fresenius Kabi.

9. Intensive Insulin Therapy and Pentastarch Resuscitation in Severe Sepsis. / Franc M., Brunkhorst V. D., Christoph Engel M. D. [et al] // N Engl J Med. – 2008. – V. 358. – P. 125-139.
10. Шлапак І. П. Інфузійна терапія. / Шлапак І. П., Нетяженко В. З., Галушко О. А. // К.: Лотос, 2013. – 307 с.
11. Шиффман Ф. Д. Патолофізіологія крові. / Шиффман Ф. Д. // М.: Бинном, 2014. – 448 с.
12. Трутяк І. Р. Інфузійна терапія та реінфузія крові у лікуванні постраждалих з тяжкою закритою поєднаною травмою живота. / Трутяк І. Р., Жуковський В. С. // Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник. – К., 2015. – Вип. 38. – С. 472-473.

Надійшла 08.11.2017 року.

УДК 616.4+616-08-035

ФІБРИНОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ КРОВІ ПРИ ІНТЕНСИВНІЙ ЦИТОСТАТИЧНІЙ ТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА ЛЕЙКЕМІЮ

А. В. Старіков, Л. В. Баронська

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

***Резюме.** У роботі наведені особливості зміни низки показників фібринолітичної системи крові у хворих на лейкемію в умовах проведення інтенсивної терапії. Встановлено, що застосування інтенсивної терапії на основі плазмаферезу сприяє зменшенню проявів тромбо-геморагічних ускладнень.*

***Ключові слова:** фібринолітична активність, цитостатична терапія, лейкемія.*

FIBRENOLYTIC ACTIVITY OF BLOOD AT THE PATIENS WITH LEUKEMIA IN INTENSIVE CYTOSTATIC TREATMENT

B. V. Staricov, L. V. Baronskaya

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

***Summary.** In the article have been focusis on the particular indecis fibrinolytic activity of blood in a conditions of intensive treatment. It was establish what the use of intensive treatmen on the basis of plasmapheresis can dicreas trombo-hemorrhagic disorders.*

***Key words:** fibrinolytic activity, cytostatic treatment, leukemia.*

Вступ. Актуальність питання інтенсивної терапії при гематологічній патології обумовлена інтенсифікацією методів терапії захворювань системи крові, в тому числі лейкемій, депресуючим впливом на кровотворення багатьох терапевтичних заходів. Лікування геморагічних порушень пов'язано із значними труднощами, в зв'язку з чим виявлення механізмів цих порушень та пошук нових засобів їх корекції є актуальним [1, 5]. Нами проаналізовані літературні дані та власний досвід інтенсивної терапії гемореологічних порушень у хворих з онкогематологічною патологією. Результати досліджень свідчать, що у хворих на лейкемію існує схильність до розвитку тромбогеморагічних порушень. Виявлені порушення в фібринолітичній системі (плазмін-антиплазмін) та висока схильність рецепторів бластних клітин до тканинного фактору, що може сприяти розвитку ДВЗ синдрому та кровотечі.

Виходячи з патогенетичних особливостей лейкемій (анемія, тромбоцитопенія, коагулопатія) нами були проаналізовані особливості низки показників фібринолітичної системи крові в умовах проведення супровідної детоксикації при цитостатичній терапії у хворих на лейкемію.

Мета роботи – вивчення основних показників фібринолітичної системи крові у хворих на гостру лейкемію та визначення їх взаємозв'язку з терапевтичними детоксикаційними заходами.

Матеріали і методи. Обстежено 25 хворих на гостру лейкемію віком від 20 до 60 років. Досліджувалися показники фібринолітичної системи крові, в умовах проведення інтенсивної терапії, при наявності коагулологічних порушень (носові та гастро-інтестинальні кровотечі, підшкірні гематоми). Хворі отримували інфузійну детоксикаційну терапію, до складу якої входили кристалоїди (фізіологічний 0,9% розчин та розчини Рінгера і Хартмана). При токсичному гепатиті в детоксикаційну терапію хворих був включений розчин реосорбілакту в об'ємі до 400 мл. Анемію коригували замісною терапією еритроцитовмісними середовищами для підтримання гематокриту на рівні 25-30%, тромбоцитопенію – замісною терапією концентратом тромбоцитів до

безпечного рівня кров'яних пластинок. У разі виникнення порушень в системі фібринолітичної активності крові в замісну детоксикаційну терапію включали лікувальний плазмаферез в об'ємі до 800,0 мл з компенсацією вилученої плазми. Фібринолітичну активність крові досліджували за допомогою визначення показників: фібриногену, продуктів деградації фібриногену, концентрації мономерних розчинних комплексів, активності плазміну в крові та проактиватора плазміногена [1].

Результати та їх обговорення. У хворих на лейкемію, внаслідок проведення цитостатичної терапії, виявлялась нудота, блювота, погіршення показників водно-електролітного балансу та зміна показників кислотно-лужної рівноваги. Відомо, що застосування таких препаратів для корекції гіповолемії як реополюглюкин, похідні ГЕК супроводжується негативним впливом на показники системи гемостазу у хворих з порушеннями тромбоцитарно-судинної ланки гемостазу. Тому, в інтенсивну терапію був залучений поліфункціональний розчин реосорбілакт в об'ємі до 400 мл і досліджувався його вплив на низку показників коагуляційного гемостазу у хворих без коагуляційних порушень, які знаходилися на лікуванні у відділенні інтенсивної терапії МКЛ № 9 м. Києва. Призначення розчину реосорбілакту не спричиняло значних змін у системі гемостазу, в зв'язку з цим він був застосований в терапії хворих із гемокоагуляційними порушеннями.

Результати дослідження фібринолітичної активності крові у хворих на лейкемію наведені в табл. 1. Проведення відповідної інтенсивної терапії на основі детоксикаційних інфузійних розчинів та плазмаферезу сприяло достовірній зміні більшості лабораторних показників, що досліджувались.

Таблиця 1 – Динаміка показників фібринолітичної активності крові у обстежених хворих ($M \pm m$), $n=15$

Показники фібринолітичної активності крові	До лікування	Після лікування
Фібриноген, г/л	$0,62 \pm 0,03$	$1,20 \pm 0,04^*$

Продукти деградації фібриногену, г/л	$0,40 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,05^*$
Концентрація розчинних мономерних комплексів, г/л	$0,08 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,04$
Рівень плазміну в крові, ммоль/л	$34,0 \pm 0,2$	$21,1 \pm 0,1^*$
Рівень проактиватора плазміногена, ммоль/л.	$153,1 \pm 0,06$	$116,0 \pm 0,05^*$

Примітка. *значення результатів дослідження, різниця між якими до та після лікування була достовірною ($P < 0,05$)

Так, застосування комплексної детоксикаційної терапії сприяло зростанню рівня фібриногену і зниженню продуктів деградації фібриногену в крові та рівня плазміну в 1,6 рази, рівня проактиватора плазміногена в 1,3 рази. В той же час відбувалось зменшення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів, що може свідчити про зниження внутрішньосудинної активації крові внаслідок проведеного лікування.

Після проведення інтенсивної терапії спостерігалось поліпшення клінічного стану хворих, про що свідчило зменшення таких геморагічних проявів як носові, гастро-інтестинальні кровотечі, відбувалася поступова редукція підшкірних висипів.

Висновки

Застосування методів інтенсивної терапії у хворих на лейкемію на основі інфузійно-детоксикаційної терапії та плазмаферезу сприяло зменшенню фібринолітичної активності крові за рахунок зниження рівня плазміну, активатора плазміногена та продуктів деградації фібрину, що покращувало клінічний стан хворих.

Література

1. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы. Москва, 1988. – 526 с.
2. Y. Nadir. Hemostatic balance on the surface of leukemic cells: the role of tissue factor and urokinase plasminogen activator receptor/ Y. Nadir, T. Katz // The hematology journal. – 2006. – № 11. – P. 1549 – 1557.

3. Hoffman M. A cell based model of hemostasis/ Hoffman M., Monroe D. // Trombhemost. – 2006. –V. 85. – P. 958 –965.
4. Tissue factor expression in human leukemic cells. / Hair G. A., Padula S., Zeff B. [et al] // Leuc Res. – 2003. – V. 20. – P. 1-11.
5. Рагимов А. А. Трансфузиология. / Рагимов А. А. – М.: Гэотар-Медиа, 2012. – 1184 с.

Надійшла 08.11.2017 року.

УДК 616-006.4+612.119+616.419

**ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИМИ КЛІТИНАМИ
КІСТКОВОГО МОЗКУ МЕМБРАННИХ АНТИГЕНІВ CD34, CD117, CD33,
CD38 У ХВОРИХ НА МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНИЙ СИНДРОМ –
РЕФРАКТЕРНУ АНЕМІЮ ІЗ НАДЛИШКОМ БЛАСТІВ ІІ В ДИНАМІЦІ
ЗАХВОРЮВАННЯ**

**Г.С.Стародуб, Н.В. Горяїнова, О.В. Басова, Т.П.Перехрестенко, В.О.
Кубарова, Н.М. Третяк А.І. Гордієнко**

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ.

Резюме. Мета: вивчення особливості експресії антигенів CD34, CD117, CD33, CD38 пухлинними клітинами периферичної крові (ПК) та кістковий мозок (КМ) хворих на МДС РАНБ ІІ в залежності від відповіді на терапію.

Матеріали та методи. Обстежено 32 хворих на МДС РАНБ ІІ, із них 13 чоловіків та 19 жінок, котрі дали письмову згоду на участь у дослідженні. Вік хворих коливався в межах від 58 до 79 (медіана 69,4) років. Методом проточної лазерної цитометрії визначали експресію пухлинними клітинами ПК та КМ хворих на МДС РАНБ ІІ антигенів CD34, CD117, CD38, CD33 за допомогою відповідних моноклональних антитіл.

Висновки. Проведене дослідження свідчить про взаємозв'язок між відповіддю на лікування, клініко-гематологічними показниками та динамікою експресії мембранних маркерів CD34, CD117, CD38, CD33 клітинами попередницями КМ хворих на МДС РАНБ ІІ.

Ключові слова: мієлодиспластичний синдром, кістковий мозок, периферична кров, імунофенотип.

**FEATURES OF THE EXPRESSION OF CD34, CD117, CD33 AND CD38
MEMBRANAL ANTIGENES BY BONE MARROW HEMOTOETIC CELLS
IN PATIENTS WITH MYELODISPLASTIC SYNDROME – REFRACTORY**

ANEMIA WITH EXCESS OF BLASTS-2 IN THE COURSE OF THE DISEASE

G.S. Starodub, N.V. Goryainova, O.V. Basova, T.P. Perekhrestenko, V.O. Kubarova, N.M. Tretiak, A.I. Gordienko

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. Aim. To study the peculiarities of the expression of CD34, CD117, CD33, CD38 tumor cells of the peripheral blood and bone marrow in patients with MDS of RAEB II, depending on the response to therapy.

Materials and methods. 32 patients at the MDS RAEB II were examined, of which 13 men and 19 women, who gave written consent to participate in the study. The age of the patients ranged from 58 to 79 (median 69.4) years. The method of flow-through laser cytometry was determined by expression of tumor cells of PC and KM patients with MDS RAEB II antigens of CD34, CD117, CD38, CD33 using appropriate monoclonal antibodies.

Conclusions. The conducted study indicates the relationship between the response to treatment, clinical and hematological parameters and the dynamics of expression of membrane markers CD34, CD117, CD38, CD33 in the cells of the precursors of bone marrow patients with MDS RAEB II.

Key words: myelodysplastic syndrome, bone marrow, peripheral blood, immune pheno The myelodysplastic syndrome (MDS) includes a heterogeneous group of diseases of clonal origin based on the pathology of hematopoietic stem cells.

Вступ. Мієлодиспластичний синдром (МДС) належить до клінічно, морфологічно, генетично гетерогенної групи захворювань, що характеризується клональністю та виникає внаслідок мутації в гемопоетичній клітині-попередниці [1, 2]. Диференціювання нащадків такої трансформованої стовбурової клітини призводить до неефективного дозрівання клітин мієлоїдного паростку та диспластичних змін у кістковому мозку (КМ). Зважаючи на те, що МДС характеризується прогресуючим несприятливим перебігом та високою ймовірністю його трансформації в гостру лейкемію, на поточний момент вибір терапії ґрунтується на відповідності хворого групі ризику прогресування процесу [1, 3].

Під час визначення групи ризику трансформації МДС в гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ) приймають до уваги відсоток бластних клітин в КМ, наявність окремих цитогенетичних аномалій та в якій кількості паростків спостерігається цитопенія в периферичній крові (ПК). Наведені показники в 1987 році були

систематизовані в Міжнародній прогностичній бальній системі (IPSS) для МДС, яка в 2012 році була оновлена додатковими цитогентичними абераціями [3]. Інша система для предикції перебігу захворювання – Прогностична бальна система ВООЗ (WPSS) належить до більш удосконалених інструментів та враховує морфологічний варіант МДС, особливості каріотипу та потребу в гемотрансфузії [4].

Факторами, які потенційно спроможні використовуватись під час оцінки тривалості періоду безпрогресивного перебігу МДС, трансфузійної незалежності та прогнозування резистентності до терапії є показники експресії кластерів диференціації (CD) на клітинах мієлоїдного походження. Зокрема, розроблена Проточна цитометрична бальна система (FCSS) для оцінки прогнозування перебігу МДС включає в себе відсоток клітин мієлоїдного паростку з атиповою експресією CD45, CD34, CD117, CD33, CD13, CD11b, CD5, CD7, CD19, CD13/16, CD56 та HLA-DR [5, 6].

Так, хворі на МДС із помірними відхиленнями імунофенотипу, що оцінено відповідно до FCSS, мають довшу безпрогресивну та загальну виживаність. Натомість, наявність мієлоїдних клітин із суттєво аберантним імунофенотипом є предиктором появи трансфузійної залежності та трансформації МДС у ГМЛ [7].

В іншому дослідженні підтверджено, що кількість CD34 та CD 34/CD 117-позитивних клітин прямопропорційно корелює з скороченням часу до трансформації МДС в ГМЛ [7].

Деякими дослідженнями підтверджено наявність залежності між вмістом CD34⁺, CD 34⁺/CD38⁺ та CD34⁺/CD38⁻ клітин та групою ризику МДС. Зокрема, відповідно до даних L.J Li та співавт. (2010 р.), середній відсоток CD34⁺ клітин вищий у хворих на МДС високої групи ризику та пацієнтів із МДС/ГМЛ [9].

Метою дослідження було вивчення особливості експресії антигенів CD34, CD117, CD33, CD38 пухлинними клітинами периферичної крові (ПК) та

кістковий мозок (КМ) хворих на МДС РАНБ II в залежності від відповіді на терапію.

Матеріали та методи. В ході дослідження обстежено 32 хворих на МДС РАНБ II, із них 13 чоловіків та 19 жінок, котрі дали письмову згоду на участь у дослідженні. Вік хворих коливався в межах від 58 до 79 (медіана 69,4) років. Діагноз встановлювали за критеріями ФАБ класифікації (з урахуванням змін, внесених ВООЗ у 2004 та 2008 рр.) [4] на підставі даних клінічного обстеження, результатів цитологічних, цитохімічних, гістологічних, імунологічних досліджень клітин та виключивши існування інших захворювань. Групу ризику встановлювали за Міжнародною прогностичною системою балів (IPSS) [8] для МДС.

Методом проточної лазерної цитометрії визначали експресію пухлинними клітинами ПК та КМ хворих на МДС РАНБ II антигенів CD34, CD117, CD38, CD33 за допомогою відповідних моноклональних антитіл.

Було проаналізовано зв'язок між відповіддю на лікування та рівнем експресії антигенів CD38, CD34, CD33, CD117 на клітинах ПК та КМ хворих на МДС РАНБ II. Бластні клітини вважались позитивними з експресією CD38, CD117, CD34, якщо зазначені маркери виявлялись на 10 та більше відсотках клітин. CD33-позитивними вважались клітини з експресією на рівні та вище 20% антигену. Статистичний аналіз проводили за допомогою Microsoft Excel 2010 (Microsoft), Statistics for Windows 7.0 (Stat. Soft inc., USA). Достовірність розбіжностей визначали за допомогою t-критерія Стьюдента для непараметричних даних. Критичне значення рівня значимості ($p < 0,05$).

Лікування хворих на МДС РАНБ II проводили після повного клініко-гематологічного обстеження з урахуванням показників ПК та КМ, переважанням клінічних проявів.

Основним методом лікування для усіх хворих була хіміотерапія малими дозами цитозару по 10-20 мг/м² двічі на добу підшкірно до 14 діб кожного

місяця впродовж щонайменше 3-4 місяців. Термін спостереження за хворими складав 6-17 місяців.

Для корекції анемічного синдрому використовували трансфузії відмитих еритроцитів, геморагічні прояви корегували застосуванням діцинону, транексанової кислоти, свіжозамороженої плазми, трансфузіями тромбоконтрату.

Відповідь на терапію оцінювали за критеріями, запропонованими міжнародною робочою групою (критерії IWG 2008). Повна ремісія визначалась [8], якщо рівень гемоглобіну досягав >110 г/л, тромбоцитів $>100 \times 10^9$ /л, гранулоцитів $>1,5 \times 10^9$ /л, а відсоток бластів у КМ знижувався $< 5\%$ та були відсутні ознаки дисплазії. Часткова ремісія констатувалась за цими ж критеріями, але зі зменшенням кількості бластів у КМ на 50% від вихідного рівня та з можливими диспластичними змінами. Гематологічна відповідь означала велику еритроїдну відповідь, якщо рівень гемоглобіну підвищувався більше, ніж на 20 г/л, та малу еритроїдну відповідь при зростанні показника гемоглобіну на 10-20 г/л. Гематологічна відповідь як велика тромбоцитарна означала підвищення тромбоцитів на $30,0 \times 10^9$ /л та більше, а мала – підвищення тромбоцитів на $10-30 \times 10^9$ /л. Стабілізація захворювання констатувалась при відсутності ознак гематологічного покращення або при прогресуванні патологічного процесу не раніше як мінімум за 2 місяці. Якщо клініко-гематологічна компенсація не спостерігалась, виявлялось зростання молодих формених елементів у ПК та КМ більше ніж на 50 відсотків, констатувалась прогресія захворювання.

В залежності від відповіді на терапію хворих було поділено на групи. Хворі до лікування склали групу I. Групу II склали пацієнти, які відповіли на терапію позитивно та стали трансфузійно незалежними більше 2-х місяців. Хворі, що дали тільки малу гематологічну відповідь та залишилися трансфузійно залежними, а також пацієнти, що не відповіли на лікування склали групу III.

Результати та їх обговорення. Обстежено 43 хворих на МДС РАНБ II. В ході проведення лікування 9 хворих померли внаслідок приєднання інфекційно-запальних ускладнень, двоє пацієнтів виведені із дослідження у зв'язку з розвитком токсичного гепатиту. Проаналізовано результати досліджень 32 хворих, із них 13 чоловіків та 19 жінок. Перебіг захворювання – МДС РАНБ II не залежав від статі та віку, відзначався поліморфізмом клінічних проявів, таких як астеничний синдром у 93% пацієнтів, підвищення температури тіла у 12 (37%), осалгії/артралгії у 15 (47%) хворих, гепатомегалія у 16 (50%), спленомегалія у 7 (22%) обстежуваних хворих. Геморагічний синдром у вигляді висипки на шкірі нижніх кінцівок та геморагій різної величини та термінів давності на тулубі спостерігались у 18 (56%) хворих. Розбіжностей у посиндромній характеристиці між чоловіками та жінками не виявлено.

Аналіз показників гемограми до лікування обстежуваних хворих на МДС РАНБ II встановив існування анемії у 100% хворих (табл. 1). Зростання кількості лейкоцитів відмічалось 42% хворих, кількість бластів у ПК $3,9 \pm 0,05$ виявлялась у 56% пацієнтів. У 96% хворих до проведення лікування виявлена тромбоцитопенія до $(52,4 \pm 9,8) \times 10^9/\text{л}$, у КМ всіх хворих до лікування виявлено до $(18,2 \pm 0,5) \%$ бластних клітин. Гіперпластичний КМ характеризував гемопоез 76,4% пацієнтів – кількість міелокаріоцитів складала $(426,2 \pm 69,5) \times 10^9/\text{л}$. Гіперплазія еритроїдного паростка КМ була встановлена у 82,5% випадків, з ознаками мегалобластної кровотворення у 98% випадків. Спостерігалась затримка дозрівання еритроїдних клітин на рівні поліхроматофільних нормобластів у 87% пацієнтів, зменшення кількості міелокаріоцитів у 76,7% хворих та омолодження гранулоцитарного паростка у 91% осіб з МДС РАНБ II.

Після проведеного лікування повну ремісію не встановлено у жодного пацієнта. У 9 пацієнтів було отримано гематологічну відповідь, у 2 констатовано часткову ремісію. Всі 11 хворих стали трансфузійно незалежними і їх об'єднали в групу II (група II з клініко-гематологічна компенсація). Групу

III увійшло 21 пацієнтів у котрих не отримано позитивної відповіді і вони залишилися трансфузійно залежними.

Порівняльний аналіз даних гематологічного обстеження пацієнтів в період клініко-гематологічної компенсації свідчить, що середні значення основних показників ПК та КМ істотно відрізнялись від відповідних показників в ініціальному періоді (група I). Кількість еритроцитів збільшилась в 1,4 рази ($p \leq 0,05$), в 1,7 рази підвищився вміст тромбоцитів, в 1,4 рази виросла концентрація гемоглобіну. Рівень лейкоцитів знизився в 7,1 рази ($p \leq 0,5$), в 3,9 рази зменшився відсоток бластів у лейкограмі. Вміст бластів у КМ зменшився в 1,7 рази ($p \leq 0,05$) порівняно із їх кількістю у групі хворих до лікування.

Гематологічні показники групи хворих, котрі не відповіли на лікування (група III) залишилися зниженими. Кількість еритроцитів була практично на рівні групи I, вміст гемоглобіну також не підвищувався і відповідав визначенню анемії середнього ступеня тяжкості. Зберігалась тромбоцитопенія (табл. 1). Знизився вміст лейкоцитів в 1,3 рази порівняно з ініціальним періодом, проте відсоток бластних клітин в лейкограмі підвищився в 1,7 разів. Кількість бластних клітин у КМ залишилась тотожною їх вмісту в групі I.

Таблиця 1. – Показники ПК та КМ у хворих на МДС РАНБ II в залежності від відповіді на терапію

Показник	Групи хворих		
	МДС РАНБ II до лікування (n=32) (M±m)	МДС РАНБ II з позитивною відповіддю на лікування (n=11) (M±m)	МДС РАНБ II без відповіді на лікування (n=21) (M±m)
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	2,3 ± 0,5	3,2 ± 2,5	1,9 ± 0,5
Гемоглобін, г/л	65,6 ± 2,7	91,3 ± 3,5	63,8 ± 0,3
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	24,2 ± 0,5	3,4 ± 0,5	18,5 ± 2,6
Тромбоцити, $\times 10^9/л$	52,4 ± 9,8	87,3 ± 7,5	49,5 ± 8,7
Бласти крові, %	3,9 ± 0,05	1,0 ± 0,05	6,5 ± 0,9

Метаміелоцити, %	2,5 ± 0,6	2,9 ± 0,3	1,9 ± 0,5
Нейтрофіли паличко ядерні, %	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	3,9 ± 0,5
Нейтрофіли сегментоядерні, %	36,7 ± 0,5	49,1 ± 1,4	36,7 ± 2,5
Лімфоцити, %	40,5 ± 0,9	38,6 ± 2,5	42,3 ± 4,6
Моноцити, %	15,3 ± 1,7	12,4 ± 1,3	17,5 ± 1,9
Бласти КМ, %	18,2 ± 0,5	10,8 ± 0,5	19,5 ± 0,5

Аналіз експресії гемопоетичними клітинами КМ мембранних антигенів CD34, CD117, CD38, CD33 свідчить про зміну цих показників у хворих на МДС РАНБ II в залежності від відповіді на лікування.

Порівнюючи рівень експресії досліджуваних антигенів клітинами КМ в різних групах хворих, виявлено, що в групі хворих, які позитивно відповіли на лікування відсоток клітин з експресією CD34⁺ антигену був у 1,4 рази нижчим, ніж в ініціальній групі у майже однакової кількості хворих (81%, 84% відповідно). Рівень гемопоетичних клітин з експресією CD34⁺ CD117⁺ в групі II був у 8,1 рази нижчий, порівняно з показниками групи I і спостерігався у меншій (на 12%) кількості пацієнтів, ніж в групі I. В 1,6 рази знижувався рівень експресії антигену CD34⁺ CD38⁺ у хворих, які позитивно відповіли на лікування (табл. 2). Встановлено зменшення вмісту клітин, що експресують антиген CD34⁺ CD38⁻ в 1,9 рази у 45% хворих, котрі позитивно відповіли на лікування, порівняно з групою пацієнтів до лікування. Кількість клітин у КМ з експресією антигену CD33⁺ була в обох групах порівняння однаковою, але експресія CD33⁺ виявилась у 63% хворих групи II та у 37% хворих групи I, тобто в 1,7 рази частіше в групі II.

Таблиця 2. – Експресія мембранних антигенів CD34, CD117, CD38, CD33 гемопоетичними клітинами КМ хворих на МДС РАНБ II з різною відповіддю на лікування

Показник	Групи хворих на МДС РАНБ II					
	до лікування група I (n=32) (M=m)		група II з позитивною відповіддю на лікування (n=11)		група III без відповіді на лікування (n=21)	
	% клітин	кількість хворих, %	% клітин	кількість хворих, %	% клітин	кількість хворих, %
CD34 ⁺	42, 4 ± 3,5	27 (84%)	31,5 ± 2,3	9 (81%)	48,6 ± 5,6	19 (90%)
CD34 ⁺ CD117 ⁺	59, 8 ± 7,9	30 (93 %)	33,1 ± 2,8	9 (81%)	62,4 ± 8,5	20 (95%)
CD34 ⁺ CD38 ⁺	45,6 ± 4,2	26 (81%)	28,2 ± 1,5	10 (90%)	58,5 ± 7,3	17 (80%)
CD34 ⁺ CD38 ⁻	24,5 ± 5,3	16 (50%)	12,5 ± 2,1	5 (45%)	31,5 ± 4,8	3 (14%)
CD33 ⁺	61, 4 ± 4,6	12 (37%)	57,5 ± 3,4	7 (63%)	63,5 ± 5,2	12 (57%)

Порівняльним аналізом експресії мембранних антигенів CD34, CD117, CD38, CD33 гемопоетичними клітинами КМ хворих групи I до лікування та групи III, котрі не відповіли на лікування встановлено зростання клітин, що експресують CD34⁺ CD38⁻ антиген в 1,3 рази у 14% хворих групи III. Експресія антигену CD33⁺ виявлена у більшої (в 1,5 рази) кількості хворих групи III, проте вміст гемопоетичних клітин з цим маркером був однаковим.

Рівень експресії CD34⁺ CD117⁺ та CD38⁺ виявлявся однаковим у хворих групи I та групи III і у 83-95% хворих обох груп.

Порівняння показників експресії мембранних антигенів, що вивчаються в групі II – хворі, які позитивно відповіли на лікування, та групи III – хворі, котрі не відповіли на лікування, і була констатована стабілізація процесу, встановило зменшення експресії цих антигенів. Так, рівень CD34⁺ виявлявся в 1,5 рази нижчим у пацієнтів групи II, ніж у хворих групи III, вміст CD34⁺ CD117⁺ в 1,9, а CD34⁺ CD38⁺ у 2,0 рази меншим в групі II, ніж у хворих групи III.

Експресія антигену CD34⁺/CD38⁻ гемопоетичними клітинами КМ у групі ІІІ – хворі, які не відповіли на лікування, була у 2,5 рази вища, ніж у хворих групи ІІ, котрі позитивно відповіли на терапію. Експресія маркера CD33⁺ клітинами КМ була майже однаковою як у пацієнтів групи ІІІ, так і у хворих групи ІІ, і у однакової кількості пацієнтів у цих групах порівняння.

Висновки

Проведене дослідження свідчить про взаємозв'язок між відповіддю на лікування, клініко-гематологічними показниками та динамікою експресії мембранних маркерів CD34, CD117, CD38, CD33 клітинами попередницями КМ хворих на МДС РАНБ ІІ.

Література

1. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet / L.Malcovati, E. Hellström-Lindberg, D. Bowen [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122, N. 17. – P. 2943-2964.
2. Bejar R. Recent developments in myelodysplastic syndromes / R. Bejar, P. David // *Blood* – 2014. – Vol. 124. – P. 2793-2803.
3. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes / L. Peter Greenberg, H. Tuechler, J. Schanz [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 120, N. 12. – P. 2454-2465.
4. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM) / M.G. Della Porta, H. Tuechler, L. Malcovati et al. // *Leukemia*. – 2015. Vol. 29, N. 7. – P. 1502-1513.
5. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes / S.C. Chu, T.F. Wang, C.C. Li [et al.] // *Leuk Res*. – 2011. – Vol.35, N.7. – P. 868-873.

6. A Comparative Assessment of Flow Cytometric Scoring Systems in MDS / L. E. Brodersen, A. Menssen, B. K. Zehentner [et al.] // Blood. – 2014. – Vol.124. – P. 5589.

7. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes / C. Alhan , T. M. Westers , E. M. Cremers [et al.] // BJH. – 2014. – Vol. 167. – P. 100-109.

8. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry / A. A. van de Loosdrecht, T. M. Westers , A.H. Westra [et al.] / Blood. – 2008. – Vol. 111, N. 3. – P. 1067-1077.

9. Abnormalities of CD34+ cells differentiation and bone marrow cell cycle in myelodysplastic syndrome / L.J. Li, R. Fu, Z.H. Shao [et al.] // Zhonghua Nei Ke Za Zhi. –2010. – Vol. 49, N.11. – P. 963-966.

Надійшла 10.11.2017 року.

УДК 616.155.18

ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ У ПАЦІЄНТІВ З В-КЛІТИННИМИ НЕХОДЖКІНСЬКИМИ ЛІМФОМАМИ

У. В. Тимошенко

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»

Резюме. Мета. Вивчити функціональний стан цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) еритроцитів у хворих на В-клітинні неходжкінські лімфоми (В-НХЛ) залежно від режиму і тривалості лікування.

Матеріали і методи. Обстежено 14 пацієнтів з В-НХЛ, які отримували хіміотерапію за режимами СНОР, СНОЕР, СОР, FC, 29 пацієнтів, які отримували R-СНОР, R-СНОЕР, R-СОР, R-FC, 21 пацієнт з аутоімунною гемолітичною анемією (АІГА) та 28 практично здорових осіб. Здійснено вимірювання проникності еритроцитарних мембран за методом сечовинного гемолізу (ПЕМ), осмотичної (ОРЕ) та перекисної резистентності (ПРЕ) еритроцитів.

Результати. Виявлено статистично достовірні відмінності між ступенем гемолізу ПЕМ у здорових осіб та групою хворих на АІГА і групою пацієнтів з В-НХЛ, які не отримували ритуксिम ($P < 0,05$). У пацієнтів усіх груп спостереження зафіксовано підвищення показників ПРЕ порівняно зі здоровими особами. Виявлено достовірну статистичну відмінність показників інтенсивності гемолізу ОРЕ у свіжих і інкубованих зразках крові здорових осіб порівняно з пацієнтами з В-НХЛ, які не отримували ритуксिम і

пацієнтами з АІГА ($P < 0,05$). Водночас, не виявлено відмінностей у показниках гемолізу між групами пацієнтів з В-НХЛ і АІГА.

Висновок. Отримані результати дослідження вказують на збільшення проникності еритроцитарної мембрани під впливом хіміотерапії. Найбільша кількість осіб з порушенням функцій ЦПМ еритроцитів виявлена серед пацієнтів з В-НХЛ, які отримували хіміотерапію без ритуксиму. Функціональні порушення ЦПМ пацієнтів з В-НХЛ усіх груп спостереження схожі з такими у хворих на АІГА.

Ключові слова: лімфома, осмотичний лізис, клітинна мембрана, ритуксим.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE CYTOPLASMIC MEMBRANE OF PATIENTS WITH B-CELL NON-HODZHKIN'S LYMPHOMA

U. V. Tymoshenko

SI "Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine", Kyiv

Resume. Aim. To study the functional state of the cytoplasmic membrane (CPM) of erythrocytes of patients with B-cell non-Hodgkin's lymphomas (B-NHL), who depends on the method and duration of treatment.

Materials and methods. We examined 14 patients with B-NHL who received chemotherapy in CHOP, CHOEP, COP, FC regimens, 29 patients who received R-CHOP, R-CHOEP, R-COP, R-FC, 21 patients with autoimmune hemolytic anemia (AIGA) and 28 practically healthy individuals. We measured the permeability of erythrocytic membranes by method of urea hemolysis (PEM), osmotic (ORE) and peroxide resistance (EPR) of erythrocytes.

Results. There were statistically significant differences between the levels of hemolysis of PEM in healthy subjects and group of patients with AIGA and group of patients with B-NHL who did not receive rituxim ($P < 0,05$). In all surveillance groups was observed an increase in EPR as compared with healthy subjects. A reliable statistical difference was found between levels of ORE hemolysis of healthy persons and B-NHL patients who did not receive rituxim and of patients with AIGA in fresh and incubated blood ($P < 0,05$). At the same time, there were no differences between the groups of patients with B-NHL and AIGA.

Conclusion. The results of the study indicate a negative influence of chemotherapy on permeability of the erythrocytic membrane. There were most of pathological changes of CPM was found among patients with B-NHL who received chemotherapy without rituxim. Functional disorders of the erythrocytic CPM of patients with B-NHL in all observational groups were similar to patients with AIGA.

Key words: lymphoma, osmotic lysis, cell membrane, rituxim.

Вступ. Одним із факторів регуляції біохімічних і фізіологічних клітинних процесів та підтримки гомеостазу є стан еритроцитарного мембранного апарату [13]. На структурно-функціональні властивості еритроцитарної мембрани безпосередньо впливає цілий комплекс як ендогенних, так і екзогенних чинників, спричиняючи деструкцію ліпідного бішару [3, 5, 8-10]. Збільшення мембранної проникності еритроцитів і вихід у кров'яне русло

внутрішньоклітинних біоорганічних сполук є ускладненням пухлин лімфоїдної системи у 73-79% випадків. При цьому не лише розвиток основного патологічного процесу, а й негативна дія терапевтичних препаратів на клітинну мембрану може спричиняти гемоліз [7, 16-18]. Клітинні мембрани регулюють транспорт іонів та молекул і мають неоднакову проникність для різних речовин [11]. Найбільший коефіцієнт проникності крізь цитоплазматичний ліпідний бішар має вода (10^{-2} см/с), дещо менший – сечовина, триптофан та глюкоза (10^{-6} – 10^{-8} см/с). Для катіонів коефіцієнт проникності приблизно в 10 раз нижчий, ніж для води (10^{-10} – 10^{-14} см/с) [12, 14]. Тому визначення стійкості еритроцитів до осмотичного лізису має важливе значення для оцінки функціонального стану мембранного апарату при патологічних станах організму.

Мета. За допомогою дослідження осмотичної резистентності еритроцитів (ОРЕ), проникності еритроцитарних мембран за методом сечовинного гемолізу (ПЕМ), перекисної резистентності еритроцитів (ПРЕ) вивчити функціональний стан цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) еритроцитів у хворих на В-клітинну неходжкінську лімфому (В-НХЛ) залежно від режиму і тривалості лікування

Матеріали та методи дослідження. В дослідженні використовувалася венозна гепаринізована кров 43 осіб, хворих на В-НХЛ, 21 пацієнта з аутоімунною гемолітичною анемією (АІГА) та 28 донорів крові (контрольна група).

Хворі на В-НХЛ розподілені на групи:

група I – пацієнти, які отримували хіміотерапію за режимами СНОР, СНОЕР, СОР, FC;

група II – пацієнти, які отримували хіміотерапію за режимами R-СНОР, R-СНОЕР, R-СОР, R-FC, тобто із застосуванням ритуксиму.

У деяких випадках для більш наочного статистичного аналізу група II додатково поділялася на:

група IIa – пацієнти, які отримали від 1 до 3 курсів хіміотерапії із застосуванням ритуксиму;

група Ів – пацієнти, які пройшли 4 - 9 курсів.

Пацієнти з АІГА віднесені до групи ІІІ.

Пацієнти з В-НХЛ та АІГА звертались за допомогою до ДУ «ІГТ НАМН»: Київського міського гематологічного центру, відділення цитогенетичної діагностики та лікування онкогематологічних захворювань (зав. – д. м. н. проф. Сівкович С. О.), відділення трансфузіології та інтенсивної терапії (зав. – д. м. н. проф. Старіков А. В.) а також проходили консультаційно-діагностичне обстеження у групі імуногематології (зав. – ст. н. с., к. м. н. Павлюк Р. П.). Пацієнти надали інформаційну згоду на участь у наукових дослідженнях. Контрольні зразки донорів крові надані Київським міським центром крові, Житомирським обласним центром крові, Комунальним закладом Київської обласної ради «Київський обласний центр крові».

Виконання вимірювань показників ПЕМ проводили за методом Колмакова В. Н. і Радченко В. Г. [6]. Готували 5 робочих розчинів з наступними об'ємними співвідношеннями сечовини до 0,9% розчину NaCl: 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35. Оптичну густину надосадової рідини вимірювали при довжині хвилі 540 нм в кюветі 10 мм. Ступінь гемолізу (ПЕМ) розраховували:

$$\text{ПЕМ} = \frac{E_n}{E_{et}} \times 100\%,$$

де E_n – оптична густина надосадової рідини в пробірках з робочими розведеннями;

E_{et} – оптична густина надосадової рідини в пробірці з еталоном 100% гемолізу.

На основі середніх значень ($M \pm m$) отриманих показників будували криві зміни ПЕМ для всіх груп спостереження.

Згідно класифікації Колмакова В. Н., Радченко В. Г. [6] розрізняли наступні типи кривої ПЕМ: ІV – показники норми, ІІІ – різке зниження всіх точок кривої, ІІ – помірне зниження, І – підвищення ПЕМ. Залежно від

характеру кривої підвищення ПЕМ виділяли декілька підтипів її зміни: ІА – підвищення проникності в верхній частині кривої, ІБ – тотальне підвищення проникності, ІВ – підвищення проникності в нижній частині кривої, а також змішаний тип ІА/ІВ – зниження в верхній і підвищення в нижній частині. Вважається, що підтип ІВ асоціюється з наявністю осередка запалення в організмі. Підтипи ІА та ІБ можуть бути пов'язані зі зміною структури білкових компонентів еритроцитарної мембрани.

Для оцінки ПРЕ використовували метод Григорович Н. А. та співавторів [1]. Оптичну густина надосадової рідини дослідних проб вимірювали при довжині хвилі 540 нм і довжині оптичного шляху 3 мм. Відсоток гемолізу вираховували за формулою:

$$\text{ПРЕ} = \frac{A}{B} \times 100\%,$$

де А - оптична густина надосадової рідини в дослідній пробі;

В - оптична густина надосадової рідини в пробі зі 100 % гемолізом.

У здорових осіб гемоліз ПРЕ не повинен перевищувати 12 % [1].

Визначення ОРЕ здійснювали за методом у модифікації Ідельсона Л.І. [15]. Дослідження проводили у зразках крові відразу після забору і у зразках, інкубованих за температури 37°C протягом 24 годин. Постановку реакції здійснювали у таких розведеннях NaCl, %: 0,1; 0,2; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75; 0,85. Оптичну густина надосадової рідини вимірювали при довжині хвилі 500-560 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Інтенсивність гемолізу виражали у відсотках і обчислювали за формулою:

$$\text{ОРЕ} = \frac{E_x}{E_1} \times 100\%,$$

де E₁ – екстинція надосадової рідини в пробірці з 0,1 % розчином NaCl;

E_x – екстинція дослідної проби;

100 – процент гемолізу в пробірці з 0,1% розчином NaCl.

Під максимальною ОРЕ розуміли розведення, при якому спостерігається руйнування 100 % еритроцитів. Мінімальна ОРЕ – розведення NaCl, при якому

гемоліз складає 0%. У здорових осіб максимальна ОПЕ свіжозабраної крові знаходиться на рівні 0,35-0,40 % розчину NaCl, мінімальна – на рівні 0,50-0,55%, максимальна ОПЕ інкубованої крові – на рівні 0,40-0,45% розчину NaCl, мінімальна – 0,60-0,70% [2, 15].

Статистичний аналіз отриманих результатів дослідження здійснювали за допомогою пакета статистичних програм StatSoft STATISTICA 10.0.1011. Для оцінки достовірності відмінностей між групами спостереження застосовували метод непараметричної статистики критерій рангів Вальда-Вольфовіца.

Результати та їх обговорення. У результаті дослідження виявлено, що у пацієнтів, які отримували лікування з ритуксिमом (група II), спостерігався I тип кривої ПЕМ, який характеризувався підвищенням усіх точок гемолізу порівняно з контролем (рисунок 1).

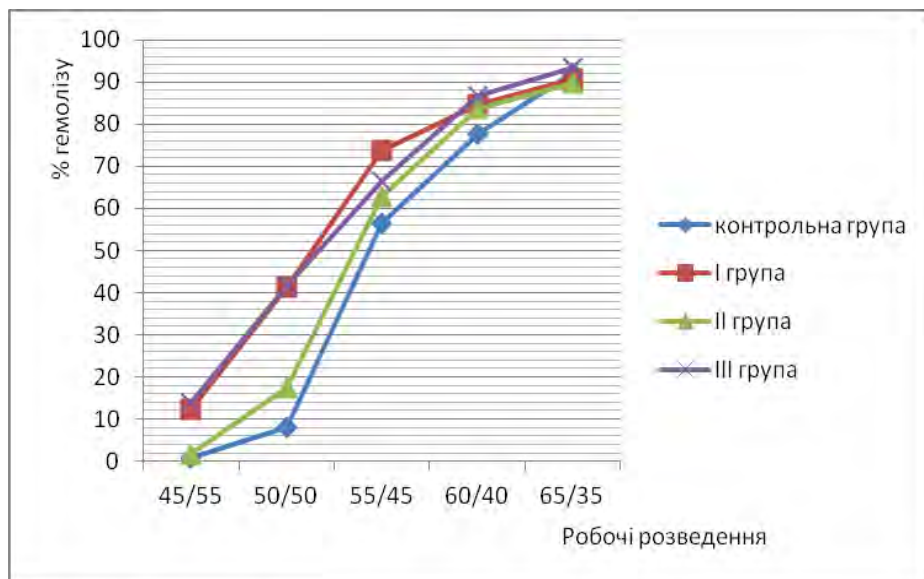


Рис. 1. Типи ПЕМ, характерні для хворих груп спостереження.

Для груп I і III характерним було тотальне підвищення проникності порівняно з контролем (ІБ підтип кривої ПЕМ), що може вказувати на структурні зміни білкових компонентів еритроцитарної мембрани у таких хворих.

Відмінності ПЕМ між групами спостереження найкраще ілюструє порівняння ступеня гемолізу в об'ємному співвідношенні 45/55. Обрахування

рівнів статистичної значимості за допомогою критерію рангів Вальда-Вольфовіца дало можливість виявити статистично достовірні відмінності між ступенем гемолізу у контрольній групі та групах I і III ($P < 0,05$).

Отже, функціональні показники стану еритроцитарної мембрани у групі хворих, які отримували терапію з ритуксимом, не відрізнялися від осіб контрольної групи. Показники пацієнтів, які отримали від 1 до 3 курсів лікування із застосуванням ритуксиму, не відрізнялися від показників ПЕМ пацієнтів на 4-9 курсах, тобто незалежно від тривалості лікування стан еритроцитарної ЦПМ за рівнем ПЕМ не змінювався. Натомість, у хворих після хіміотерапії проникність ЦПМ зростала порівняно з контрольною групою. Крім того, нами не виявлено достовірної різниці при порівнянні ступеня гемолізу між групами III і I, тобто функціональні показники стану ЦПМ еритроцитів за ПЕМ у пацієнтів з В-НХЛ, які отримували хіміотерапію, були схожі з такими у хворих на АІГА.

При оцінці функціонального стану ЦПМ високий рівень ПРЕ вказує на деградацію гліцерофосфоліпідів біліпідного шару мембрани, що призводить до підвищення індексу сферичності еритроцитів, зменшення еластичності, збільшення осмотичної крихкості і фрагментації ЦПМ та збільшення проникності клітинної мембрани до гемоглобіну [4].

У пацієнтів усіх груп спостереження зафіксоване підвищення показників ПРЕ порівняно з контрольною групою (таблиця 1).

Таблиця 1 – Величини ПРЕ у хворих різних груп спостереження

Групи спостереження	М±m, % гемолізу
Група I, n = 10 ^{1;2}	52,1±5,42
Група II, n = 29 ¹	36,03±4,6
Група III, n = 12 ¹	64,42±8,36
Контрольна група, n = 20	9,45±0,44

Примітки:

1 – рівень статистичної значимості $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою;

2 – рівень статистичної значимості $P > 0,05$ порівняно з групою III.

Практично у всіх осіб, які входили до груп спостереження, відсоток гемолізу при постановці методики ПРЕ був вищим за норму. Все ж у деяких пацієнтів спостерігалися величини ПРЕ в межах норми, однак це поодинокі випадки, кількість яких недостатня для висновків. Так у групі III (лікування ритуксимом) таких осіб четверо, в інших групах хворих подібних випадків не зафіксовано.

Показники ПРЕ всіх груп спостереження статистично відрізнялися від показників контрольної групи. Між групою пацієнтів, які отримували хіміотерапію без ритуксиму (II) і групою пацієнтів з АІГА (III) статистично достовірної відмінності не знайдено (таблиця 1). Тривалість лікування із застосуванням ритуксиму не впливала на ПРЕ, про що свідчив рівень статистичної достовірності ($P > 0.05$) при порівнянні пацієнтів, які перебували на 1-3 курсах терапії (група IIa) з пацієнтами на 4-9 курсах (група IIb).

Важливе значення в діагностиці гемолітичних станів має визначення стійкості еритроцитів до осмотичного лізису. ОРЕ залежить від ступеня зрілості клітин, форми, змін складу плазми. Еритроцити зі структурними аномаліями ЦПМ або які вступили в фазу завершення свого життєвого циклу мають збільшений індекс сферичності та знижену осмотичну стійкість. Осмотично стійкішими (демонструють підвищення рівнів ОРЕ) є менш зрілі еритроцити, які щойно потрапили в кровотік із кісткового мозку, вони мають пласку дископодібну форму і малий індекс сферичності [12].

При аналізі ОРЕ у обстежуваних осіб у групі I зафіксована найбільша частка хворих з такими параметрами як: знижений рівень мінімальної ОРЕ свіжозабраної та інкубованої крові, знижений рівень максимальної ОРЕ інкубованої крові (таблиця 2).

Таблиця 2 – Характеристика відмінних від норми показників ОРЕ у хворих на В-НХЛ

Групи спостереження	Свіжа кров								Інкубована кров							
	Початок гемолізу				Повний гемоліз				Початок гемолізу				Повний гемоліз			
	Знижений рівень		Підвищений рівень		Знижений рівень		Підвищений рівень		Знижений рівень		Підвищений рівень		Знижений рівень		Підвищений рівень	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
I, n = 13	7	53,8	-	-	2	15,4	-	-	8	61,5	-	-	-	-	1	7,7
Па, n = 16	2	12,5	-	-	1	6,25	1	6,25	6	37,5	1	6,25	3	18,75	2	12,5
Пб, n = 12	2	16,7	-	-	-	-	2	16,7	7	58,3	-	-	1	8,3	-	-

Найбільше хворих з відхиленнями від норми показників у інкубованій крові виявлено у групі Па. У цій групі найбільше пацієнтів з підвищенням мінімальної та максимальної ОРЕ та зі зниженим рівнем максимальної ОРЕ. У групі Пб найбільше хворих серед усіх груп спостереження з підвищенням рівня максимальної ОРЕ. Підвищеного рівня мінімальної ОРЕ не зафіксовано у жодній з груп.

Загалом, найбільша кількість осіб з ознаками патологічних змін ОРЕ виявлена у групі I, що вказує на суттєвий негативний вплив хіміотерапії на проникність еритроцитарної мембрани. З початком терапії із застосуванням ритуксиму показники ОРЕ покращувалися порівняно з показниками у хворих,

які приймали хіміотерапію без ритуксиму. Так, у групі Іа спостерігалось збільшення кількості осіб з компенсаторним виходом у кров'яне русло молодих форм еритроцитів, тобто, з підвищеними рівнями ОРЕ, що мало місце у свіжозабраних та інкубованих зразках крові.

При продовженні терапії ритуксимом (Ів) переважала кількість пацієнтів у відсотковому відношенні зі зниженими показниками мінімальної ОРЕ, у котрих підвищувався вміст еритроцитів, що перебували на завершальній фазі клітинного життєвого циклу. Однак, спостерігалось збільшення відсотка пацієнтів із пулом осмотично стійкіших молодих форм еритроцитів, на що вказувало підвищення рівня ОРЕ.

У кожній з груп спостереження хворих на В-НХЛ були пацієнти, у яких відмінні від норми показники ОРЕ фіксувалися лише в інкубованій крові, в той час як показники ОРЕ свіжозабраної крові знаходилися в нормі. У групі І таких випадків було 3, у групі Іа – 6, у групі Ів – 5.

У нормі у свіжозабраній крові початок гемолізу реєструється при концентрації розчину NaCl 0,5%, в інкубованій – при 0,6%. У цих розведеннях допускається наявність відповідно 0-6% та 0-40% гемолізованих еритроцитів [15]. При обстеженні контрольної групи зафіксовано близько 3% гемолізованих еритроцитів у зразках свіжозабраної крові та близько 12% в інкубованій (таблиця 3).

Таблиця 3 – Інтенсивність гемолізу ОРЕ у зразках крові осіб різних груп спостереження у відсотках

Групи спостереження	Свіжозабрана кров, на рівні 0,5% р-н NaCl	Інкубована кров, на рівні 0,6% р-н NaCl
	M±m, % гемолізу	
Група І, n = 14	29,79±7,28	32,31±4,95

Група IIa, n = 16	8,69±3,3	24,13±6,64
Група IIb, n = 13	7,92±2,42	22,69±3,11
Група III, n = 21	34,38±6,07	47,4±8,52
Контрольна група, n = 28	2,71±0,32	11,75±2,03

У хворих усіх груп спостереження середні величини гемолізу у зразках свіжозабраної крові перевищували показники контрольної групи. Найбільша частка гемолізованих еритроцитів виявлена у групі I, до того ж у цій групі зафіксований найбільший відсоток пацієнтів зі зниженням рівня початку гемолізу (зниженням мінімальної OPE) як свіжозабраної крові, так і інкубованої. Тобто, гемоліз еритроцитів наставав при концентраціях NaCl близьких до фізіологічної.

У інкубованій крові середні показники OPE всіх груп пацієнтів хоча і не виходили за межі норми, все ж були вищими за показники контрольної групи. У пацієнтів групи I відсоток гемолізованих еритроцитів наближався до крайньої верхньої межі.

У свіжозабраних і інкубованих зразках крові виявлено достовірну статистичну відмінність показників інтенсивності гемолізу контрольної групи з групами I і III ($P < 0,05$). У той час при порівнянні показників між групами I і III достовірної різниці не виявлено, отже стан ЦПМ за OPE у хворих, що перебували на хіміотерапії, схожий з таким у хворих на АІГА.

Висновки

1. Для групи пацієнтів, які отримували хіміотерапію без застосування ритуксиму і групи пацієнтів з АІГА характерним було тотальне підвищення ПЕМ порівняно з контролем, що може свідчити про структурні зміни білкових компонентів еритроцитарної мембрани у таких хворих.

2. У переважної більшості пацієнтів, які отримували хіміотерапію без застосування ритуксиму спостерігався знижений рівень мінімальної ОРЕ свіжозабраної та інкубованої крові та знижений рівень максимальної ОРЕ інкубованої крові порівняно з нормою. Це може вказувати, що у кров'яному руслі таких хворих збільшується кількість еритроцитів з підвищеним індексом сферичності порівняно зі здоровими особами.

3. У групі пацієнтів, які приймали хіміотерапію із застосуванням ритуксиму порівняно з групою пацієнтами, які перебували на хіміотерапії без ритуксиму спостерігалось збільшення відносної кількості осіб з підвищеними рівнями ОРЕ свіжозабраної та інкубованої крові, яке може вказувати на компенсаторний вихід у кров'яне русло молодих форм еритроцитів під впливом терапії ритуксимом.

4. У пацієнтів усіх груп спостереження зафіксовано підвищення показників ПРЕ порівняно з контрольною групою.

5. Тривалість лікування із застосуванням ритуксиму не призводила до зниження рівня ПРЕ до нормальних референтних значень, тобто ознаки деградації фосфоліпідів клітинної мембрани еритроцитів у пацієнтів з В-НХЛ не зникали під впливом хіміотерапії з ритуксимом.

Література

1. А. с. 1704083 СССР, МКИ G 01 N 33/50. Способ оценки перекисной резистентности эритроцитов / Н.А. Григорович, А.С. Мавричев, Г.Ю. Бычков, А.А. Лысенко (СССР). – № 4726724/14 ; заявл. 02.08.89 ; опубл. 07.01.92, Бюл. № 1.

2. Доссе Ж. Иммуногематология; [перевод с французского Ю.И. Лорие]. – Москва : Медгиз. – 1959. – 638 с.

3. Изучение структурных и функциональных свойств мембран у беременных женщин с малым весом плода / Аскарбаева К. А., Сейдахметова З. Ж., Койбасова Л. У. [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 5. – С. 30 – 32.

4. Карагезян К. Г. Фосфолипиды-глицериды, перекисная резистентность эритроцитов, уровень в них малонового диальдегида и содержание α -токоферола в плазме крови и эритроцитах крыс с аллоксановым диабетом до и после применения комбинированной антиоксидантотерапии / К. Г. Карагезян, Д. М. Геворкян // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 35, № 5. – С. 27-30.

5. Кислотная, осмотическая и ультразвуковая резистентность эритроцитов больных, получающих лечение регулярным гемодиализом / В. Н. Спиридонов, Ю. А. Борисов, Е. Н. Левыкина [и др.] // Нефрология. – 2004. – Т. 8, № 3. – С. 22-31.

6. Колмаков В. Н. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени / В.Н. Колмаков, В.Г. Радченко // Терапевтический архив. – 1982. – Т. LIV, № 2. – С. 59 – 62.

7. Кущевой Е. Роль иммунобиологической терапии в лечении хронических лимфопролиферативных заболеваний / Е. Кущевой, Г. Галковская // Клиническая онкология. – 2013. – Т. 9, № 1. – С. 113 – 120.

8. Молдакаримов С. Б. Влияние 1,1-диметилгидразина на состояние мембран эритроцитов человека в условиях *in vitro* / С.Б. Молдакаримов // Известия НАН РК. Серия биологическая. – 2006. – № 1. – С. 46 – 50.

9. Нагорная Н. В. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки / Нагорная Н. В., Четверик Н. А. // Здоровье ребенка. – 2010. – Т. 23, № 2. – С. 140 – 145.

10. Осмотическая резистентность мембран эритроцитов у крыс с гипер- и гипокальциемией [Электронный ресурс] / Козаев А. В., Джигоев И. Г., Кабоева Б. Н., Батагов Ф. Э. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. – Режим доступа к журн.: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=13921>

11. Остапченко Л. І. Біологічні мембрани: Методи дослідження структури та функцій: навчальний посібник / Л. І Остапченко, І. В. Михайлик. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. – 215 с.
12. Патологическая физиология / [под ред. А. Д. Адо, Л. М. Ишимовой]. – М.: Медицина, 1980 – 520 с.
13. Показатель проницаемости эритроцитарных мембран в оценке функционального состояния организма / В. А. Мойсеенко, Л. И. Антоненко, Л. Л. Аршинников [и др.] // Крымский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 2, № 2. – С. 103 – 107.
14. Потапенко А. Я. Осмотическая устойчивость эритроцитов : учебное пособие / Потапенко А. Я., Кягова А. А., Тихомиров А. М. – ГОУ ВПО ГРМУ, 2006. – 16 с.
15. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / [под ред. М. А. Базарновой, В. Т. Морозовой]. – К.: Выща школа, 1988. – 317 с.
16. Сиюхова Д. Б. Способы коррекции анемии у онкологических больных / Сиюхова Д. Б., Бабичева Л. Г. // Вестник АГУ. – 2016. – Т. 186, № 3. – С. 61-66.
17. A Case of Non-Hodgkin`s Lymphoma in Patient with Coomb`s Negative Hemolytic Anemia and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura / S. Y. Park, S. Kim, E. S. Kim [et al.] // Cancer Res Treat. – 2012. – V. 44, № 1. – P. 69 – 72.
18. Johnson S. T. One center`s experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia – a new paradigm / Johnson S. T., Fueger J. T., Gottschall J. L. // Transfusion. – 2007. – Vol. 47, № 4. – P. 697-702.

Надійшла 21.09.2017 року.

УДК 547.963.1+616-097: 616.155.392.2

ЕКСПРЕСІЯ CD38 І ВУГЛЕВОДНІ ДЕТЕРМІНАНТИ ЛЕЙКЕМІЧНИХ В-ЛІМФОЦИТІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ

О. О. Шалай, Г. Б. Лебедь, В. А. Барілка, Я. І. Виговська, Н. Я.

Томашевська, В. Є. Логінський

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Резюме. Досліджено вуглеводні детермінанти мембран лейкоцитних лімфоцитів за допомогою 12 лектинів основних груп вуглеводної специфічності у 65 хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ). Проведено визначення взаємозв'язку між рівнем експресії рецепторів лектинів і CD38 антигену. Встановлено, що підвищення експресії CD38 супроводжується збільшенням числа клітин, на поверхні яких містяться антиген Томсена-Фріденрайха (лектин PNA) та глікозидні залишки антигену А (лектин SBA), властиві для О-гліканів, термінальна Фука (лектин LAL) та знижується рівень сіалізованих поліантенних N-гліканів з ланцюгам комплексного (I і II) і гібридного типу (RCA, PHA-L, WGA, STL).

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, В-лімфоцити, CD38, лектини, вуглеводні детермінанти

EXPRESSION OF CD38 AND CARBOHYDRATE DETERMINANTS ON LEUKEMIC B-LYMPHOCYTE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

O. O. Shalay, G. B. Lebed, V. A. Barilka, Y. I. Vygovska, N. Y. Tomashevskaya,

V. E. Loginsky

SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine", Lviv

Summary. Carbohydrate determinants of leukemic lymphocyte membrane were studied in 65 patients suffering from chronic lymphocytic leukemia (CLL) using panel of 12 lectins with main carbohydrate specificity. The interconnection between the level of expression lectin receptors and CD 38 antigen was determined. It has been found that the higher CD 38 expression level is accompanied with an increased number of cells the surface of which contains Thomsen-Friedenreich antigen (PNA lectin) and glycosidic remains of A antigen (SBA lectin), peculiar to N-glycans, terminal Fuca (LAL lectin) and a decreased level of sialysed polyantennae N-glycans with complex-type chains (I and II) and hybrid-type chains (RCA, PHA-L, WGA, STL).

Key words: chronic lymphocytic leukemia, B-lymphocytes, CD38, lectins, carbohydrate determinants

Вступ. Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) найчастіша форма лейкемії в Європі, представляє собою В-клітинну проліферацію з характерним фенотипом пухлинних лімфоцитів CD5⁺CD19⁺CD23⁺, з клінічно гетерогенним перебігом. [5].

Дослідники постійно ведуть пошук таких фенотипових ознак лейкоцих лімфоцитів (поверхневих клітинних маркерів, імунологічних, генетичних), які б визначали перебіг і прогноз при ХЛЛ і одночасно були б доступними для повсякденної діагностичної практики гематології [7]. Найбільшу увагу привертає антиген CD38. Показано, що його експресія на неопластичних лімфоцитах визначає клінічний перебіг та загальне виживання хворих на ХЛЛ [5, 7]. Обговорюється роль CD38 як сигнальної молекули у регуляції виживання лейкоцих клітин при ХЛЛ, зв'язок рівня її експонування з мутаційним статусом IgVH і геномними абераціями.

Поверхневі антигени лімфоїдних клітин, як білки мембрани, переважно представлені глікопротеїнами. Різноманітність глікопротеїнів мембрани (глікокод за Габіусом [4]) визначає фенотипові особливості різних за походженням клітин, забезпечує міжклітинну і внутрішньоклітинну передачу сигналів (інформації), які регулюють життєдіяльність клітини, та її взаємодію з іншими клітинами і мікрооточенням [6, 8]. Однак визначення фенотипу глікопротеїнів пухлинних клітин за допомогою «дешифраторів глікокоду» – лектинів мало поширене [1, 3]. Особливості поверхневих вуглеводних детермінант, яким належить важлива роль у міжклітинній взаємодії [2, 3, 4, 8] і тим самим у здатності до поширення лейкоцих лімфоцитів при ХЛЛ, менше вивчені ніж CD антигени, а зв'язок між ними взагалі поза увагою дослідників.

Метою цієї роботи було визначення взаємозв'язку між рівнем експресії рецепторів лектинів і CD38 антигену залежно від характеру розподілу відсотка CD38-позитивних клітин у хворих на ХЛЛ.

Матеріали і методи. Вуглеводні компоненти лейкоцих клітин за допомогою лектинів і експресію CD38 досліджували у 65 хворих на В-ХЛЛ (45 чоловіків і 20 жінок) віком від 38 до 79 років. У двох випадках дослідження проводилось повторно у перебігу хвороби. Діагноз ХЛЛ встановлювали на підставі клініко-лабораторних досліджень відповідно до критеріїв Національного інституту раку (NCI), включно з цитологічним та

імунофенотиповим дослідженням клітин периферичної крові і/або кісткового мозку [9]. У всіх хворих діагностовано типову В-клітинну ХЛЛ.

Відповідно до загальноприйнятих класифікацій стадій ХЛЛ за Rai та Binet обстежених хворих розподілено на групи. При стадіюванні за Rai виділено групу проміжного ризику – 21 хворий на В-ХЛЛ I-II стадії та групу високого ризику – 46 хворих III-IV стадії. Відповідно у 27 випадках діагностовано стадію А-В хвороби і у 40 випадках – стадію С за Binet.

У периферичній крові лімфоцитоз складав до 50% у 2, понад 50% у 65 випадках. Абсолютна кількість лімфоцитів периферичної крові становила у 4 пацієнтів до 10×10^9 /л, у 11 – $10-20 \times 10^9$ /л, понад 20×10^9 /л – у 51 хворого. Анемію (Hb <110 г/л) виявлено у 45 (67%) осіб, тромбоцитопенію ($<100 \times 10^9$ /л) у 30 (45%) хворих. У всіх випадках в пунктаті кісткового мозку спостерігали високий відсоток лімфоцитів (65%-90%) з фенотипом $CD5^+CD19^+CD23^+$.

Нормальні показники профілю лектинових рецепторів і рівня експресії CD антигенів лімфоїдних клітин периферичної крові встановлено при дослідженні мононуклеарів крові у 15 здорових осіб (контрольна група) середнього віку (7 чоловіків та 8 жінок).

Мононуклеарні клітини периферичної крові виділяли у градієнті густини фікол-верографіну ($d=1,077$). Дослідження глікокон'югатів поверхневої мембрани пухлинних клітин периферичної крові і/або кісткового мозку хворих на ХЛЛ та у контрольній групі проводили за допомогою панелі з 12 лектинів, помічених пероксидазою (Лектинотест, Львів). В роботі використано лектини всіх основних груп вуглеводної специфічності: *D*-галактозоспецифічні (Gal) – аглютиніни арахісу (PNA), рицини (RCA), омели білої (ML-I); *N*-ацетил-*D*-галактозаміноспецифічні (GalNAc) – лектини виноградного слимака (HPL), сої (SBA); *D*-маннозоспецифічні (Man) лектини із насіння сочевиці харчової (LCL), гороху (PSL); *N*-ацетил-*D*-глюкозаміноспецифічні (GlcNAc) лектини – аглютинін зародків пшениці (WGA), лектин бульб картоплі (STL); *L*-фукозоспецифічний (Fuc) лектин кори золотого дощу (LAL); сіалоспецифічний

(N-ацетилнейрамінова кислота, NANA) лектин кори бузини чорної (SNL); поліспецифічний лектин із квасолі звичайної (PHA-L).

Рецептори лектинів визначали на десіалізованих нейрамінідазою клітинах за допомогою методики, описаної нами раніше [1]. Визначення лінійних, диференційних та активаційних CD антигенів лімфоцитів виконували непрямым імуофлюоресцентним методом, використовуючи моноклональні антитіла (МКАТ) до CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD38, CD95, HLA-Dr, κ , λ і μ ланцюгів Ig та як вторинні антитіла F(ab)₂ фрагменти МКАТ до Ig білої миші, помічені FITC, виробництва ІЕПОР (Київ, Україна), Dako (Данія).

Оцінку результатів фенотипування лектинових рецепторів і CD антигенів здійснювали шляхом підрахунку відсотку позитивного маркування на 200 клітин. Реакцію вважали позитивною, якщо з ним взаємодіяло >20% лімфоцитів.

Результати дослідження аналізували методами варіаційної статистики з обчисленням коефіцієнта Стюдента (t) та з використанням формули Фішера для частотних показників (p_F). Взаємозалежність між показниками парних досліджень встановлювали за коефіцієнтом кореляції (r).

Результати та їх обговорення. Встановлено, що на моноклональних В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ визначається доволі низька експресія більшості вивчених глікокон'югатів, порівняно з нормальними лімфоцитами у контрольній групі здорових осіб. Наші результати співпадають з даними літератури [3, 6], хоча деякі лектини (STL, SNL) раніше не використовувалися з цією метою.

На відміну від нормальних лімфоцитів, на яких антиген Томсена-Фріденрайха (PNA⁺) відсутній, у 27% хворих на лімфоцитах він був виявлений, що свідчить про наявність у їх мембрані O-гліканів, властивих незрілим та активованим клітинам. Істотно знижується на лейкоцитарних лімфоцитах рівень глікозидних ланцюгів I і II типу N-гліканів (RCA). Лімфоцити хворих на ХЛЛ

вірогідно слабше реагували з GalNAc α -специфічним лектином SBA, Man α -специфічним лектином PSL та GlcNAc β -специфічними лектинами (WGA і STL), поліспецифічним лектином PNA. Дещо збільшується на них експресія залишків Fuc α (табл. 1).

Дослідження антигенного профілю лейкоцитів показали, що на їх мембрані експоновані типи для ХЛЛ CD маркери. У хворих дослідної групи 60–80% лімфоцитів взаємодіяли з МКАТ до CD5, CD19, CD20, CD21, CD23, HLA-Dr, sIgM, з перевагою одного із типів легких ланцюгів Ig κ або λ низької густини (ознака їх моноклональності). Т-клітинні антигени (CD3, CD7, CD4, CD8) були представлені на мінорній популяції лімфоцитів (5-12%; залишкова популяція Т-клітин).

Ми провели дослідження взаємозв'язку між рівнем експресії рецепторів лектинів і CD38 антигену, який різною мірою представлений на лімфоцитах окремих хворих і має прогностичне значення.

Хворі були розділені на групи з низькою і підвищеною експресією цього антигену на основі характеру розподілу відсотка позитивних клітин в окремих випадках. Як видно з рисунка, для антигену CD38 порогова величина експресії для розмежування цих груп становила 30%.

Виявлено зміни структури глікопротеїнів мембрани лімфоцитів у хворих залежно від експресії CD38 (трансмембранного глікопротеїну з ензиматичною активністю, адгезивною і сигнальною функцією), важливого несприятливого прогностичного маркера лімфоцитів при ХЛЛ з підвищеною проліферативною активністю, який відображає мутації генів IgVH. Результати аналізу з урахуванням частоти випадків і % позитивних клітин наведено у таблиці 1.

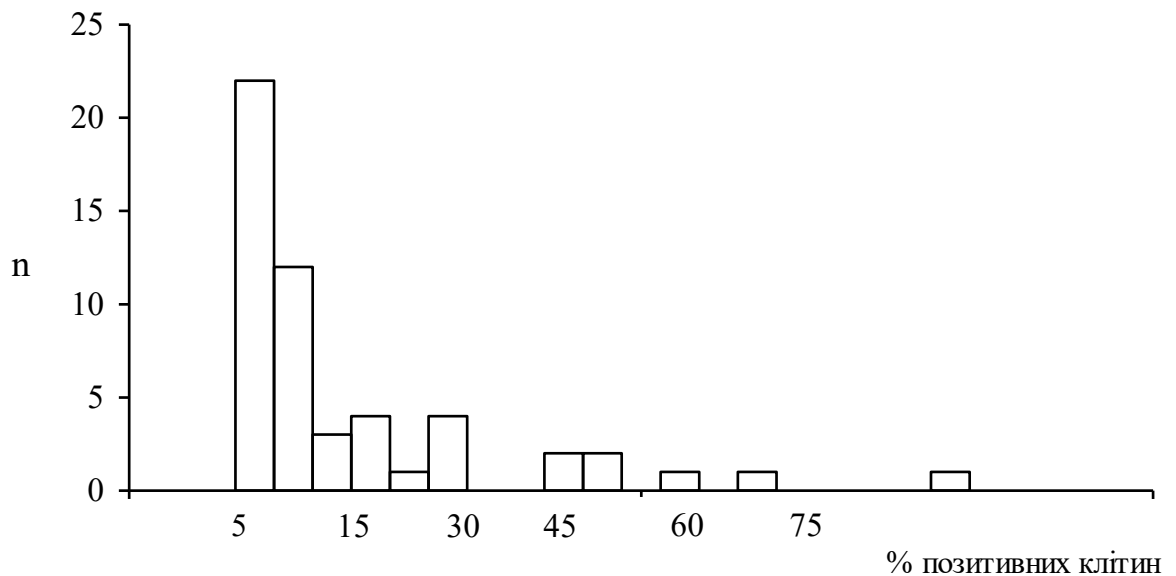


Рис. Графік частотного розподілу відсотка CD38⁺ лімфоцитів в окремих хворих на ХЛЛ.

У групі хворих з низьким рівнем експресії CD38⁺ ≤30% не виявлено вірогідних змін рівня взаємодії з лектинами порівняно з загальною групою пацієнтів.

Лейкемічні лімфоцити з підвищеною експресією CD38 (>30% CD38⁺ клітин) виявляють істотно вищий рівень взаємодії з лектином PNA (антиген T), який властивий для мембрани молодих і активованих лімфоцитів, та знижений з RCA, на них більше термінальних залишків Fucα (антиген H; лектин LAL).

Проведено кореляційний аналіз між відсотком лейкемічних клітин, що зв'язують лектини, та CD38⁺ лімфоцитів у загальній групі хворих, а також у пацієнтів з низьким і високим рівнем експресії CD38. У загальній групі хворих кореляційного зв'язку між цими величинами не знайдено (табл. 2).

Таблиця 1 – Рівень зв'язування лектинів з мембраною пухлинних лімфоцитів у хворих на ХЛЛ залежно від експресії CD38

Лектини	Специфічність	Контрольна група <i>n=15</i>	Група хворих <i>n=67</i>	CD38 ⁺ клітини	
				≤30% <i>n=47</i>	>30% <i>n=7</i>
PNA	Galβ	0/15 6,3±1,0	18/67 15,2±0,9*	11/47 14,4±1,1	4/7 19,3±1,9*
RCA	Galβ	15/15 68,5±3,9	52/61 32,7±1,4*	36/42 32,3±1,6	4/6 20,4±5,2*
ML-1	Galα	2/15 14,3±1,8	16/61 18,3±1,1	11/42 17,8±1,2	1/6 20,8±2,2
HPL	GalNAcα	0/15 4,3±1,0	3/67 7,6±0,7*	1/47 7,4±2,2	0/7 7,4±2,2
SBA	GalNAcα	3/15 15,9±1,5	3/67 9,0±0,8*	2/47 8,2±0,9	0/7 8,3±1,2
LCL	Manα, Fucα	4/15 10,9±1,9	15/67 12,0±1,1	11/47 12,2±1,3	2/7 11,2±3,6
PSL	Manα	13/15 40,4±2,8	32/61 22,0±1,1*	22/42 21,9±1,2	2/6 22,1±1,8
WGA	GlcNAcβ	15/15 61,7±3,9	44/67 35,1±2,2*	33/47 35,9±2,5	5/7 42,7±7,8
STL	GlcNAcβ	11/15 31,1±2,7	28/61 21,2±1,2*	20/42 21,9±1,4	2/6 16,6±3,2
LAL	Fucα	0/15 9,1±1,2	14/67 14,4±1,1*	6/47 13,1±1,1	4/7 20,8±4,0*
SNL	NANAα	8/15 23,3±1,8	21/67 19,3±1,4	14/47 18,7±1,3	4/7 28,5±8,3
PHA-L	Поліспецифічний	15/15 81,3±2,9	50/61 36,1±1,5*	35/42 38,1±1,7	5/6 38,1±4,3

Примітки:

1. у колонках представлено співвідношення позитивних випадків (експресія маркера >20%) до числа випадків та середня кількість позитивно реагуючих клітин;

2. * відзначено показники, що вірогідно ($p<0,05$) відрізняються від аналогічного показника попередньої групи.

Аналогічно ми не відзначили взаємозалежності між глікопротеїновими структурами мембрани лейкоцитів і кількістю CD38⁺ клітин у групі хворих з низьким рівнем експресії CD38 ($\leq 30\%$).

Високий рівень експресії CD38 ($>30\%$) корелює з підвищеним вмістом дисахариду антигену А (GalNAc α 1 \rightarrow 3Gal β ; лектин SBA), зниженням сіалізованих залишків GlcNAc β (лектин WGA, $r = -0,702$; лектин STL, $r = -0,503$) та сіалової кислоти (лектин SNL). На них менше поліантенних N-гліканів (лектин PHA-L, $r = -0,701$), про що свідчать дані таблиці 2.

Таблиця 2 – Кореляційна залежність між рівнем зв'язування лектинів та експресією CD38

Лектини	Специфічність	Заг. група	CD38 ⁺ $\leq 30\%$	CD38 ⁺ $> 30\%$
		<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
PNA	Gal β	+0,264	+0,204	-0,220
RCA	Gal β	+0,023	+0,164	+0,141
ML-1	Gala	+0,168	+0,152	-0,138
HPL	GalNAc α	+0,161	+0,330	+0,292
SBA	GalNAc α	+0,127	+0,231	+0,691*
LCL	Man α , Fuc α	+0,046	+0,188	+0,038
PSL	Man α	-0,106	-0,238	-0,328
WGA	GlcNAc β	+0,050	+0,050	-0,702**
STL	GlcNAc β	-0,270	-0,151	-0,503*
LAL	Fuc α	+0,333	+0,005	+0,517*
SNL	NANA α	+0,160	+0,068	-0,548*
PHA-L	Поліспецифічний	-0,108	-0,205	-0,701**

Примітки: 1. * кореляція середньої сили ($0,5 \leq r < 0,7$);
2. ** сильна кореляція ($r > 0,7$).

Результати проведених нами досліджень вказують на наявність зв'язку між рівнем експресії прогностично важливого антигену CD38 та лектинових рецепторів на мембрані лейкемічних В-клітин при ХЛЛ. Важливою ознакою профілю їх лектинових рецепторів є поява у 27% випадків на мембрані пухлино-асоційованого антигену Т, який виявляється лектином PNA. Слід зазначити, що антиген Т експресований більшою мірою на CD38⁺ лімфоцитах. Таким чином, CD38⁺ В-лімфоцити можна охарактеризувати як PNA⁺WGA⁻.

Характер взаємозв'язку між лектиновими рецепторами і CD антигенами переважно залишається неясним. Можна думати, що CD антигени містять глікозиди, що взаємодіють з лектинами певної специфічності, а зміни конфігурації глікозидної частини цих рецепторів впливають на їх функціональну і лектинову специфічність. Підвищення експресії CD38 супроводжується збільшенням числа клітин, на поверхні яких містяться антиген Томсена-Фріденрайха (лектин PNA) та глікозидні залишки антигену А (лектин SBA), властиві для О-гліканів, термінальна Fucα (лектин LAL) та знижується рівень сіалізованих поліантенних N-гліканів з ланцюгам комплексного (I і II) і гібридного типу (RCA, PNA-L, WGA, STL).

Висновки

1. При ХЛЛ високий рівень експресії CD38 супроводжується підвищенням відсотка клітин, на поверхні яких міститься пухлино-асоційований антиген Томсена-Фріденрайха (лектин PNA), та позитивно корелює з рівнем антигену А (лектин SBA) та термінальною Fucα (лектин LAL).

2. Підвищений рівень експресії CD38 характеризується зменшенням взаємодії клітин з лектином RCA, який виявляє глікозидні залишки Galβ, та негативно корелює із зниженням сіалізованих залишків GlcNAcβ (лектин WGA, STL), залишків нейрамінової кислоти (NANA, лектин SNL) та поліантенних N-гліканів (лектин PNA-L).

Література

1. Логінський В. Лектинзв'язувальні вуглеводні компоненти мембрани бластних клітин при гострому мієлоїдному лейкозі /В. Логінський, О. Шалай //Онкологія. – 2004. – Т. 6, № 3. –С. 231-235.
2. Пащенко С. Застосування лектинів в онкології / С. Пащенко // Онкологія 2011.– Т. 13, №3. –С. 188-191.
3. A residue critical for the binding of the tumor-associated Thomsen-Fridenreich antigen / P. Adhikari, K. Bachhawat-Sikder, C. Thomas [et al.] // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276, № 44. – С. 40734-40739.
4. Gabius H.-J. Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. / H.-J. Gabius // Anat.Histol. Embryol. – 2001 – Vol. 30, №1. – P. 3-31.
5. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. / M. Hallek, B. Cheson, D. Catovsky [et al.] // Blood. –2008. – Vol. 111, № 12. – P. 5446-5456.
6. Razi N. Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation /N. Razi, A. Varki //Glycobiol. – 1999. – Vol. 9, № 11. – P. 1225-1234.
7. Santos F. Small lymphocytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: are they the same disease? / F. Santos, S. O'Brien // Cancer J. – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 396-403.
8. Sharma V. Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site / Sharma V, Vijayan M, Surolia A. // J Biol Chem. – 1996. – Vol. 271. – P. 21209-21213.
9. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris [et al.] – Lyon: IARC, 2008. – 439 p.

Надійшла 07.11.2017 року.

УДК 616.15:616.155.294

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТРОМБОЦИТІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ІДІОПАТИЧНОЇ ТРОМБОЦИТОПЕНІЧНОЇ ПУРПУРИ

Є. В. Шороп, С. М. Шороп

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Мета. Визначити зміни морфології тромбоцитів, характерні для ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури (ІТП), та оцінити ефективність використання різних морфологічних показників у якості діагностичних критеріїв цього захворювання.

Матеріали і методи. Обстежено 58 хворих на ІТП. Групу контролю становили 87 осіб без гематологічних захворювань. За допомогою автоматичного гематологічного аналізатора визначали кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоцитів (MPV), ширину розподілу тромбоцитів за об'ємом (PDW), відсоток великих тромбоцитів (P-LCR). Методом імерсійної мікроскопії в мазках периферичної крові підраховували тромбоцитограми. За цифровими мікрофотографіями мазків крові, отриманими методом світлової мікроскопії, визначали площі тромбоцитів і вираховували за цими даними моду, середнє значення, середнє значення логарифма, коефіцієнт варіації, стандартне відхилення, стандартне відхилення логарифма, скошеність кривої розподілу. Методом проточної цитометрії визначали відсотковий вміст ретикулярних тромбоцитів та флуоресценцію тромбоцитів після фарбування РНК-специфічним барвником тіазоловим оранжевим.

Результати. В тромбоцитограмах при ІТП спостерігалось підвищення відносного вмісту форм подразнення – $(4,8 \pm 0,9)\%$ проти $(0,7 \pm 0,1)\%$ ($p = 0,0001$), а також відповідне до цього зменшення відсотку зрілих тромбоцитів – $(90,1 \pm 1,3)\%$ проти $(96,9 \pm 0,3)\%$ ($p = 0,0004$). При автоматичному аналізі крові спостерігалось збільшення показників розмірів тромбоцитів: MPV – $(10,3 \pm 0,3)$ фл проти $(9,4 \pm 0,1)$ фл ($p = 0,0065$), PDW – $(15,3 \pm 0,8)\%$ проти $(12,5 \pm 0,4)\%$ ($p = 0,0006$), P-LCR – $(28,8 \pm 1,8)\%$ проти $(22,3 \pm 0,9)\%$ ($p = 0,0022$). За даними морфометричного дослідження при ІТП виявлено збільшення статистичних показників площ тромбоцитів: середнього значення $(10,9 \pm 0,6)$ мкм² проти $(8,0 \pm 0,4)$ мкм² ($p = 0,0002$), середнього значення натурального логарифма – $2,12 \pm 0,04$ проти $1,93 \pm 0,05$ ($p = 0,0088$), коефіцієнта варіації – $(75,2 \pm 2,8)\%$ проти $(48,3 \pm 1,6)\%$ ($p < 0,0001$), стандартного відхилення – $(8,5 \pm 0,7)$ мкм² проти $(3,7 \pm 0,1)$ мкм² ($p < 0,0001$), стандартного відхилення натурального логарифма – $0,61 \pm 0,02$ проти $0,43 \pm 0,01$ ($p < 0,0001$), скошеності кривої розподілу – $3,2 \pm 0,2$ проти $1,3 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$). Методом проточної цитометрії в крові хворих на ІТП виявлено збільшення відносної кількості ретикулярних тромбоцитів – $(16,0 \pm 3,8)\%$ проти $(2,3 \pm 0,4)\%$ ($p < 0,0001$), це також супроводжувалося відповідно більшим показником флуоресценції при фарбуванні тіазоловим оранжевим – $(357,5 \pm 18,4)$ у.о. проти $(296,4 \pm 17,6)$ у.о. ($p = 0,0144$). При оцінці діагностичного значення різних показників методом аналізу кривої чутливість/специфічність найбільш ефективними виявилися підрахунок кількості ретикулярних тромбоцитів ($AUC = 0,89$) та показники площ тромбоцитів: коефіцієнт варіації ($AUC = 0,91$), стандартне відхилення ($AUC = 0,91$), стандартне відхилення логарифма ($AUC = 0,93$), скошеність кривої розподілу ($AUC = 0,92$).

Висновок. Встановлено, що характерним для ІТП є підвищення в крові відносної кількості ретикулярних тромбоцитів, у тромбоцитограмі – відсотку форм подразнення тромбоцитів; при автоматичному аналізі крові – показників MPV, PDW, P-LCR; при морфометричному аналізі в мазках крові – середніх розмірів та анізоцитозу тромбоцитів.

Серед використаних методів найбільш ефективними для діагностики ІТП є визначення кількості ретикулярних тромбоцитів в периферичній крові, а також морфометричні показники, що характеризують підвищену варіабельність тромбоцитів за розмірами.

Ключові слова: ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, ретикулярні тромбоцити, тромбоцити, морфометрія, автоматичний гематологічний аналізатор.

EFFICIENCY OF SOME MORPHOLOGICAL THROMBOCYTES PARAMETERS FOR DIAGNOSTICS OF THE IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Y. V. Shorop, S. M. Shorop

SI "Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine", Kyiv

Aim. Determine the changes in platelet morphology characteristic of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and evaluate the effectiveness of using different morphological parameters as diagnostic criteria for this disease.

Materials and methods. 58 patients with ITP were examined. The control group comprised 87 people without hematologic diseases. The number of platelets, the Mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW), and the Platelet large cell ratio (P-LCR) were determined using an automatic hematological analyzer. Thrombocytograms were calculated by immersion microscopy in peripheral blood slides. By digital micrographs of blood slides obtained by light microscopy, platelet squares were determined and the mode, mean, average logarithm, variation coefficient, standard deviation, standard deviation of logarithm, skew coefficient were calculated based on these data. Using the flow cytometry method determined the percentage of reticular platelets and platelet fluorescence after painting with an RNA-specific dye is thiazole orange.

Results. In thrombocytograms, by the ITP, an increase in the relative content of irritation forms was observed – $(4,8 \pm 0,9)\%$ versus $(0,7 \pm 0,1)\%$ ($p = 0,0001$), and corresponding to this decrease in the percentage of mature platelets – $(90,1 \pm 1,3)\%$ versus $(96,9 \pm 0,3)\%$ ($p = 0,0004$). At automatic blood count, an increase in platelet indices was observed: MPV – $(10,3 \pm 0,3)$ fl versus $(9,4 \pm 0,1)$ fl ($p = 0,0065$), PDW – $(15,3 \pm 0,8)\%$ versus $(12,5 \pm 0,4)\%$ ($p = 0,0006$), P-LCR – $(28,8 \pm 1,8)\%$ versus $(22,3 \pm 0,9)\%$ ($p = 0,0022$). According to morphometric data by the ITP, there was an increase in the statistical parameters of platelet squares: the average value $(10,9 \pm 0,6)\mu\text{m}^2$ ($8,0 \pm 0,4)\mu\text{m}^2$ ($p = 0,0002$), the mean value of the natural logarithm – $2,12 \pm 0,04$ versus $1,93 \pm 0,05$ ($p = 0,0088$), coefficient of variation – $(75,2 \pm 2,8)\%$ versus $(48,3 \pm 1,6)\%$ ($p < 0,0001$), standard deviation – $(8,5 \pm 0,7)\mu\text{m}^2$ versus $(3,7 \pm 0,1)\mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$), standard deviation of natural logarithm – $0,61 \pm 0,02$ versus $0,43 \pm 0,01$ ($p < 0,0001$), skewness coefficient – $3,2 \pm 0,2$ versus $1,3 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$). The method of flow cytometry revealed in the blood of patients with ITP an increase in the relative number of reticulated platelets – $(16,0 \pm 3,8)\%$ versus $(2,3 \pm 0,4)\%$ ($p < 0,0001$), it was also accompanied by a large index of fluorescence during coloring thiazole orange – $(357,5 \pm 18,4)$ conditional. unit against $(296,4 \pm 17,6)$ conditional. unit ($p = 0,0144$). When assessing the diagnostic value of different parameters, the sensitivity/specificity of the curve analysis method was the most effective calculation of the number of reticular platelets ($AUC = 0,89$) and platelet squares indices: variation coefficient ($AUC = 0,91$), standard deviation ($AUC = 0,91$), the standard deviation of the logarithm ($AUC = 0,93$), the skewness coefficient ($AUC = 0,92$).

Conclusion. It is established that the characteristic of ITP is an increase in the relative number of reticular platelets in the blood; in the thrombocytogram is in the percentage of platelets irritation forms; at automatic blood analysis is indicators MPV, PDW, P-LCR; at morphometric

analysis in blood slides is the average size and anisocytosis of the platelets. Among the methods used, the most effective for the diagnosis of ITP are the determination of the reticular platelets number in the peripheral blood, as well as the morphometric parameters that characterize the increased platelet variability by size.

Key words: *idiopathic thrombocytopenic purpura, reticulated platelets, platelets, morphometry, automatic hematological analyzer.*

Вступ. Як відомо, головним патогенетичним механізмом ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури (ІТП) є руйнування тромбоцитів під дією автоімунних антитіл. Внаслідок цього, у циркулюючій крові зменшується до декількох годин тривалість існування кров'яних пластинок і, відповідно, зростає частка молодих тромбоцитів, що нещодавно вивільнилися з кісткового мозку. Це супроводжується змінами морфології тромбоцитів та збільшенням відносного вмісту ретикулярних тромбоцитів (РТ) в периферичній крові. До останніх відносять молоді тромбоцити, що містять залишки РНК, які можна виявити за допомогою специфічних флуоресцентних барвників.

Можливість використання розмірних характеристик тромбоцитів та кількості РТ для диференційної діагностики ІТП до теперішнього часу вивчається науковцями різних країн [3, 4] Активність досліджень в цьому напрямі обумовлюється також наявністю сучасних методів визначення розмірних характеристик клітин крові та відсотка РТ за допомогою автоматичних гематологічних аналізаторів.

Мета. Визначити зміни морфології тромбоцитів, характерні для ІТП, та оцінити ефективність використання різних морфологічних показників у якості діагностичних критеріїв цього захворювання.

Матеріали і методи дослідження. Обстежено периферичну кров 58 хворих на ІТП. Групу контролю становили 87 осіб без гематологічних захворювань.

За допомогою автоматичного гематологічного аналізатора SYSMEX KX-21N (Японія) визначали кількість тромбоцитів, середній об'єм тромбоцитів (MPV), ширину розподілу тромбоцитів за об'ємом (PDW) та відсоток великих тромбоцитів (P-LCR).

Для оцінки морфології тромбоцитів у мазках крові, пофарбованих за Паппенгеймом, методом імерсійної мікроскопії при збільшенні $\times 1000$ підраховували тромбоцитограму, розподіляючи тромбоцити за їхніми морфологічними ознаками на зрілі, юні, старі та форми подразнення [2]. За цими ж мазками крові визначали морфометричні показники тромбоцитів методом комп'ютерного аналізу зображень. Для цього за допомогою мікрофотонасадки на мікроскопі Leica DME (Німеччина) цифровою фотокамерою робили знімки полів зору, що містили тромбоцити. На мікрофотографіях (в $\mu\text{м}^2$) визначали площу тромбоцитів як кількість точок, які утворюють їхнє зображення, помножене на масштабний коефіцієнт, визначений при вимірюванні латексних часток відомого розміру.

Як відомо, розподіл тромбоцитів у крові за розмірами має складний характер, що відрізняється з нормальним (рисунок), тому для морфометричної характеристики тромбоцитів, крім середнього значення їхніх площ (С-ПТ), вираховували ще декілька статистичних показників [1].



Рис. Розподіл тромбоцитів за площею в мазку крові особи контрольної групи.

Так, для характеристики розміру визначали площу тромбоцитів, яка найчастіше зустрічалася в мазку – моду площ тромбоцитів (М-ПТ). Показником варіабельності були середньоквадратичне відхилення (СВ-ПТ) та коефіцієнт варіації (КВ-ПТ), а тенденції до збільшення розмірів – скошеність кривої розподілу площ тромбоцитів (СК-ПТ). Крім цього, статистичний розподіл розмірів тромбоцитів наближали до нормального шляхом обчислення натурального логарифма значень площ тромбоцитів. Для отриманих величин

вираховували середнє значення (СЛ-ПТ), яке характеризувало розмір тромбоцитів, та середньоквадратичне відхилення (СВЛ-ПТ), що характеризувало варіабельності розмірів.

Кількість РТ у периферичній крові визначали методом лазерної цитофлуориметрії з використанням РНК-специфічного барвника тіазолового оранжевого. Дослідження виконувалося в плазмі, збагаченій тромбоцитами, яку отримували центрифугуванням венозної крові, стабілізованої етилендіамінтетраацетатом. Після інкубації з розчином тіазолового оранжевого проби аналізували на лазерному цитофлуориметрі FACScan (США). Для аналізу обирали дані клітин, які за параметрами прямого та бічного світлорозсіювання відносилися до регіону тромбоцитів, побудованому при аналізі даних експресії тромбоцит-специфічного антигена CD42b в паралельній пробі, визначеного з використанням відповідного моноклонального антитіла, міченого флуоресцеїном. Граничне значення параметра флуоресценції РТ було вираховане при аналізі гістограм розподілу цього показника у здорових осіб. У ході дослідження визначався відсотковий вміст РТ та середнє значення параметра флуоресценції і (в умовних одиницях).

Імовірність різниці даних контрольної групи та групи здорових осіб визначали за непараметричним критерієм Уїтні-Манна, діагностичну ефективність методом аналізу характеристикних кривих чутливість/ефективність (ROC-аналіз). При цьому ефективність виражали як значення площі під такою кривою.

Результати та їх обговорення. У хворих на ІТП мала місце значна тромбоцитопенія $(55,0 \pm 5,1) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з групою контролю $(234,3 \pm 8,4) \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,0001$).

В тромбоцитограмах хворих порівняно з групою контролю спостерігалось підвищення відносного вмісту форм подразнення – $(4,8 \pm 0,9)\%$ проти $(0,7 \pm 0,1)\%$ ($p = 0,0001$), а також відповідно до цього зменшення відсотку зрілих тромбоцитів – $(90,1 \pm 1,3)\%$ проти $(96,9 \pm 0,3)\%$ ($p = 0,0004$). Відносні

кількості юних та старих тромбоцитів не мали вірогідних різниць з нормою і, відповідно, становили $(4,3 \pm 0,8)\%$ проти $(2,0 \pm 0,4)\%$ ($p = 0,0544$) та $(0,8 \pm 0,1)\%$ проти $(0,5 \pm 0,1)\%$ ($p = 0,3962$).

При дослідженні тромбоцитів периферичної крові за допомогою гематологічного аналізатора, крім тромбоцитопенії, спостерігалось підвищення розмірних показників тромбоцитів: MPV – $(10,3 \pm 0,3)$ фл проти $(9,4 \pm 0,1)$ фл ($p = 0,0065$), PDW – $(15,3 \pm 0,8)\%$ проти $(12,5 \pm 0,4)\%$ ($p = 0,0006$), P-LCR – $(28,8 \pm 1,8)\%$ проти $(22,3 \pm 0,9)\%$ ($p = 0,0022$). Виявлені зміни свідчать про збільшення розміру тромбоцитів у крові за рахунок підвищення відносного вмісту цих клітин більших розмірів.

Збільшення розмірів тромбоцитів також було виявлено при вимірюванні їхніх площ за мікрофотографіями. Це виражалось в збільшенні С-ПТ – $(10,9 \pm 0,6)$ мкм² проти $(8,0 \pm 0,4)$ мкм² ($p = 0,0002$) та СЛ-ПТ – $2,12 \pm 0,04$ проти $1,93 \pm 0,05$ ($p = 0,0088$) у групі контролю. Поряд з тим, значення показника М-ПТ лишалося без змін – $(6,4 \pm 0,3)$ мкм² проти $(6,3 \pm 0,4)$ мкм² у групі контролю, що вказує на те, що більшість тромбоцитів при ІТП зберігають нормальні розміри, а збільшення середніх показників їхніх площ відбувається за рахунок появи в кровообігу великих кров'яних пластинок. На появу таких тромбоцитів також вказувало підвищення у хворих показника СК-ПТ – $3,2 \pm 0,2$ проти $1,3 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$). Поява великих форм тромбоцитів супроводжувалася збільшенням морфометричної варіабельності цих клітин, яка проявлялася підвищенням значень показників: КВ-ПТ – $(75,2 \pm 2,8)\%$ проти $(48,3 \pm 1,6)\%$ ($p < 0,0001$), СВ-ПТ – $(8,5 \pm 0,7)$ мкм² проти $(3,7 \pm 0,1)$ мкм² ($p < 0,0001$) та СВЛ-ПТ – $0,61 \pm 0,02$ проти $0,43 \pm 0,01$ ($p < 0,0001$).

Дослідження цитофлуориметричним методом з використанням тіазолового оранжевого показало, що в крові хворих на ІТП спостерігалось збільшення кількості ретикулярних тромбоцитів – $(16,0 \pm 3,8)\%$ проти $(2,3 \pm 0,4)\%$ ($p < 0,0001$) в групі контролю. Збільшення відносного вмісту ретикулярних тромбоцитів при ІТП також супроводжувалося підвищеною флуоресценцією

тромбоцитів – $(357,5 \pm 18,4)$ у.о. проти $(296,4 \pm 17,6)$ у.о. ($p = 0,0144$) у групі контролю.

Для визначення потенційної діагностичної цінності досліджених показників, які у хворих на ІТП мали відмінності від контрольної групи, вказані показники були піддані ROC-аналізу. Результати наведено в таблиці.

Як можна бачити з приведених даних, найбільшу цінність для діагностики ІТП можуть мати показники, що характеризують підвищення варіабельності тромбоцитів, визначені методом комп'ютерного аналізу зображень за мазками периферичної крові, а також відносний вміст РТ у периферичній крові, підрахований методом проточної цитометрії.

Таблиця – Цінність показників тромбоцитів для діагностики ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури за даними ROC-аналізу

Показники	Площа під характеристичною кривою $M \pm \sigma$
Відсоток форм подразнення тромбоцитів у тромбоцитограмі	0,76±0,05
Відсоток зрілих тромбоцитів у тромбоцитограмі	0,75±0,05
MPV	0,71±0,08
PDW	0,77±0,07
P-LCR	0,74±0,08
Середня площа тромбоцитів	0,72±0,05
Середнє значення логарифма площ тромбоцитів	0,65±0,06
Коефіцієнт варіації площ тромбоцитів	0,91±0,03
Стандартне відхилення площ тромбоцитів	0,91±0,03
Стандартне відхилення логарифма площ тромбоцитів	0,93±0,02
Асиметрія кривої розподілу площ тромбоцитів	0,92±0,03
Відсоток ретикулярних тромбоцитів	0,89±0,05
Показник флуоресценції тромбоцитів при дослідженні з тіазоловим оранжевим	0,73±0,08

Висновки

1. Особливостями тромбоцитограми у хворих на ІТП є збільшення в них відсотку форм подразнення тромбоцитів та відповідне зменшення частки зрілих тромбоцитів.

2. Характерними змінами тромбоцитів при ІТП за даними морфометричного дослідження та автоматичного аналізу крові є відносне збільшення в периферичній крові кількості великих форм цих клітин, що проявляється підвищенням їхнього середнього розміру та збільшенням морфометричної гетерогенності.

3. У хворих на ІТП в периферичній крові спостерігається збільшення відносного вмісту ретикулярних тромбоцитів та підвищення, в наслідок цього, флуоресценції тромбоцитів при фарбуванні РНК-специфічним барвником тіазоловим оранжевим.

4. Серед досліджених показників найбільшу цінність для діагностики ІТП мають показники морфометричної гетерогенності тромбоцитів та відносна кількість ретикулярних тромбоцитів в периферичній крові.

Література

1. Клетки крови — современные технологии их анализа/ Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров [и др.]. - Москва: Триада-Фарм, 2002. – 200 с.

2. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / [под ред. Е.А. Кост]. — Москва: “Медицина”, 1975. – (издание второе исправленное и дополненное). – 383 с.

3. Diagnostic value of platelet indices and bone marrow megakaryocytic parameters in immune thrombocytopenic purpura / YT. Tang, P. He, YZ. Li, HZ. Chen // Blood Coagul. Fibrinolysis.– 2017. – V. 28, №1. – P. 83-90.

4. Measurements of immature platelets with haematology analysers are of limited value to separate immune thrombocytopenia from bone marrow failure / A. Cybulska, L. Meintker, J. Ringwald, SW. Krause // Br. J. Haematol. – 2017. – V. 177, №4. – P. 612-619.

УДК 612.151-083:616.151.514.-056.7

НОВИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСУ ФАКТОРІВ VIII/ФОН ВІЛЛЕБРАНДА

Н.О. Шурко

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Резюме. Хвороба Віллебранда разом із гемофілією є найпоширенішими захворюваннями системи гемостазу. Для лікування цих захворювань використовують препарати FVIII.

Мета роботи – дослідити співвідношення факторів VIII/фон Віллебранда на різних етапах технології отримання антигемофільного препарату.

Методи дослідження: фракціонування, іонообмінна та барвник-лігандна афінна хроматографія.

Результати. У статті наведено результати досліджень очищення комплексу факторів VIII/фон Віллебранда, що є комбінацією попереднього фракціонування з наступними етапами іонообмінної та барвник-лігандної хроматографії. Охарактеризовано основні переваги цього методу.

Висновки. Встановлено, що метод афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах забезпечує збереження вихідного (фізіологічного) рівня співвідношення фактора VIII до фактора фон Віллебранда та збереження виходу продукту від вихідного до 96,32 %.

Ключові слова: фактор FVIII зсідання крові, фактор фон Віллебранда, хроматографія, фракціонування, кремнеземні сорбенти, тріязинові барвники.

THE NEW METHOD FOR OBTAINING A COMPLEX OF FACTORS VIII/VON WILLEBRAND

N.O. Shurko

SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine NAMS of Ukraine», Lviv

Summary. Willebrand's disease together with hemophilia is the most common disease of the hemostasis system. The concentrate of blood coagulation factor VIII is used for the treatment of these diseases.

Purpose of the work: investigate the proportion of factors VIII/vonWillebrand at various stages of the technology of obtaining an antihemophilic concentrate.

Methods of research: fractionation, ionexchange and dye-ligand affinity chromatography.

Results. The paper presents the results of studies of purification complex of factors VIII/von Willebrand which is a combination of the method of fractionation with the next steps of ion exchange and dye-ligand affinity chromatography. The main advantages of these methods are described.

Conclusions. Installed, that the method of affinity chromatography on silica sorbents provides preservation of the initial (physiological) level of the ratio factor VIII to von Willebrand's factor.

Key words: blood coagulation factor VIII, von Willebrand's factor, chromatography, fractionation, silica sorbents, triazine dyes.

Вступ. Відомо, що фактор VIII (FVIII) циркулює в плазмі крові разом з іншим глікопротеїном – фактором фон Віллебранда (vWF), утворюючи нековалентний комплекс [1]. Хвороба Віллебранда разом із гемофілією є найпоширенішими захворюваннями системи гемостазу [5], а причиною виникнення є дефіцит або аномальна мультимерна будова молекули vWF. Доволі часто у таких хворих спостерігається й зниження активності FVIII, як непрямий наслідок кількісних і якісних змін vWF. Для лікування обох цих захворювань використовують препарати FVIII. Крім цього, слід зазначити, що у лікуванні хвороби Віллебранда використовують і препарат десмопресин, що сприяє вивільненню ендogenous vWF з ендотеліальних клітин. У роботі [77] відмічено, що для лікування хвороби фон Віллебранда 3^{го} типу та хворих, що не дають відповіді на застосування десмопресину, використовують комплексні препарати FVIII-vWF. Вміст vWF у цих препаратах, а, відповідно, і співвідношення FVIII/vWF змінюється в дуже широких межах залежно від методів отримання. Проте, слід підкреслити, що найрозповсюдженіший спосіб отримання очищеного препарату FVIII методом іонообмінної хроматографії не дозволяє стандартизувати вміст в ньому vWF [5].

Більшість зареєстрованих препаратів FVIII розроблені для лікування гемофілії А та, відповідно, мають низький вміст vWF. Використання таких препаратів у лікуванні хвороби Віллебранда, перш за все, пов'язане з підвищеним ризиком виникнення тромбозів [1] та може стати причиною основного ускладнення такої терапії – появою інгібіторних антитіл [5, 7].

Дослідження *in vitro* продемонстрували, що використання препаратів FVIII з високим вмістом vWF, знижує ризик виникнення інгібіторів [8]. Клінічні дослідження підтвердили, що використання рекомбінантних препаратів без vWF в 2,5-3 рази збільшує ризик виникнення інгібіторних форм гемофілії [7]. Так, у роботах Mannucci P. M. і Tagariello G. [7, 8] для лікування

інгібіторних форм гемофілії А рекомендовано використовувати концентрати FVIII-vWF з високим вмістом vWF. Відносно лікування хвороби Віллебранда немає чіткої відповіді щодо співвідношення цих двох факторів, проте, у роботі Federici A. B. відмічено, що це співвідношення має бути не менше 0,77 [5]. Деякі із дослідників пропонують використовувати фактор фон Віллебранда як стабілізатор FVIII у готових препаратах на противагу альбуміну чи амінокислотам гліцину та лізину, оскільки він є природнім стабілізатором його активності [4], що не вимагає додавання стабілізаторів.

Метою роботи було – дослідити співвідношення FVIII/vWF на різних етапах технології отримання антигемофільного препарату.

Матеріали і методи дослідження. Вихідною сировиною для досліджень був препарат кріопреципітат – фракція кріоглобулінів, отримана з 1 дози свіжозамороженої плазми (СЗП), розведена до об'єму $\approx 20-30$ мл робочого буферного розчину, що містила FVIII (>70 МО/дозу), vWF (>100 МО/дозу), фібриноген (≥ 140 мг/дозу), FXIII, фібронектин та інші.

Визначення активності FVIII здійснювали уніфікованим одностадійним коагулогічним, а фактора фон Віллебранда – аглютинаційним (рістоміцин-кофакторна активність) методами. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за допомогою Кумасі діамантового голубого G-250. Синтез сорбентів з іммобілізованими тріазиновими барвниками проводили за методикою «з включенням солі» протягом тривалого часу при лужних значеннях рН [3].

Осадження білків проводили гідроксидом алюмінію (III) та розчином ПЕГ-4000 до кінцевої концентрації 3% та 32% відповідно.

У технологічний процес отримання включили етап іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та барвник-лігандної афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах.

Результати та їх обговорення. Використання хроматографічних методів у фракціонуванні плазми крові дозволило отримати препарати факторів зсідання (зокрема, FVIII) високого рівня чистоти та питомої активності [4].

Нашими дослідженнями з'ясовано, що FVIII не сорбується жодним зі синтезованих сорбентів, однак питома активність у розчині зростає, а, відповідно, відбувається процес очищення [2, 3]. Тобто, у нашому випадку зростання питомої активності FVIII зсідання крові можна пояснити явищем негативної афінної сорбції. Ми відібрали групу, для якої характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний алий 4ЖТ, Діасорб-Procion blue HB, Діасорб-Procion gelb M4R, Діасорб-Procion blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К [2]. Дані підтверджуються статистично двовибірковим t-тестом з різними дисперсіями при визначенні значущості різниці між групами. При статистичному аналізі встановлено, що існує достовірна відмінність між концентрацією нанесеного білка та сорбованого ($p \geq 0,95$), але не проявляється достовірна відмінність між активністю фактора до нанесення та у супернатанті після сорбції ($p < 0,95$) (рис. 1.).

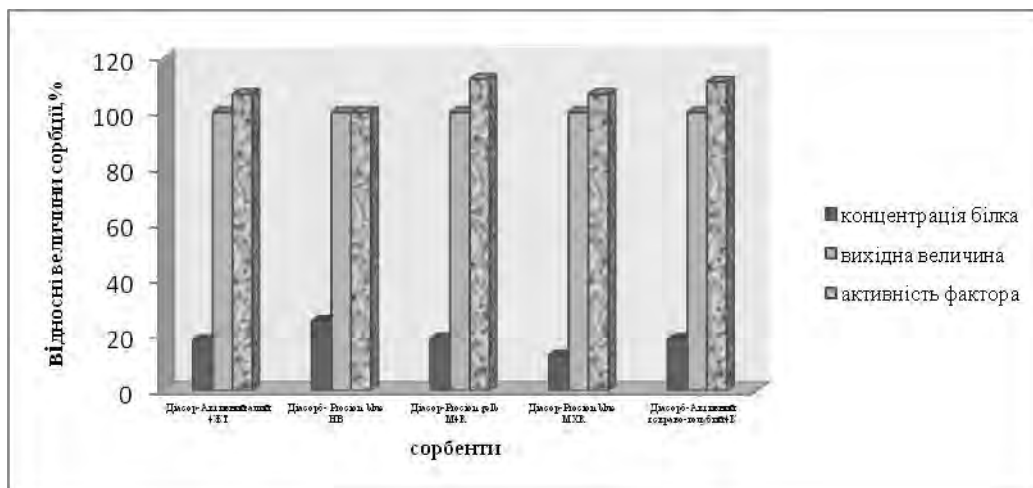


Рис. 1. Порівняльна характеристика зміни концентрації білка та активності FVIII при нанесенні на макропористі кремнеземні сорбенти.

При розробці та проведенні етапів виділення та очищення FVIII важливо враховувати співвідношення FVIII/vWF, оскільки воно має важливе значення як у процесі виробництва (захищає FVIII від протеолітичної деградації), так і в клінічному використанні отриманих препаратів фактора.

Проведені нами дослідження цього показника продемонстрували наступне: зміни у співвідношенні FVIII/vWF:R_{cof} були незначними (рис. 2), тобто синтезовані нами сорбенти проявляють негативну афінну сорбцію і по відношенню до vWF.

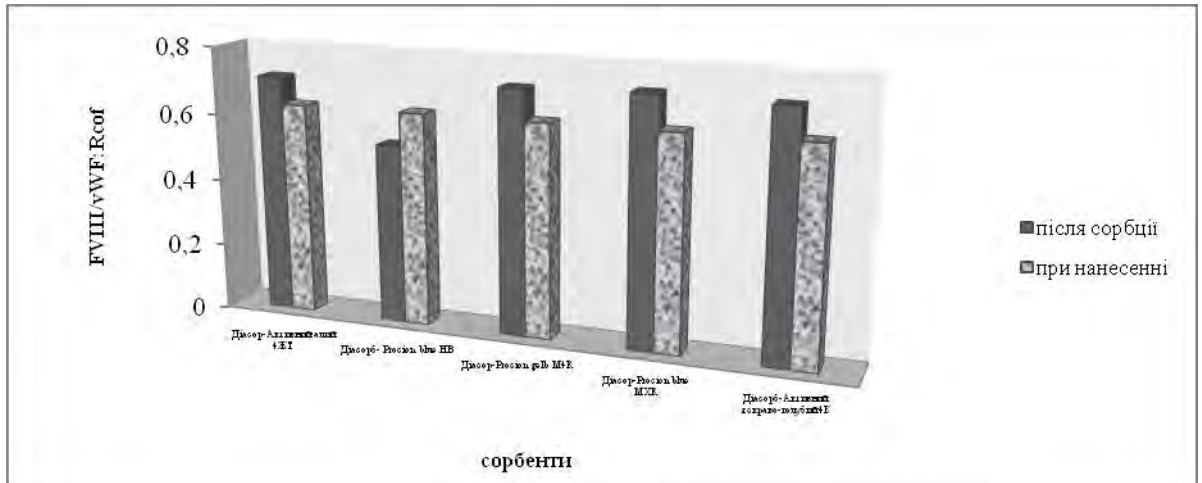


Рис. 2. Зміни у співвідношенні FVIII/vWF:R_{cof} у супернатанті під час афінної сорбції з відібраними сорбентами.

Розроблена нами схема отримання очищеного FVIII передбачала поєднання методів фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах [9]. Встановлено, що попередні етапи видалення нецільових білків приводять до значно вищого ступеня очищення кінцевого препарату. Це, очевидно, зумовлено тим, що метод іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose використовується також для отримання інших факторів зсідання крові, зокрема, тромбіну, FVII та FIX [6]. Попереднє видалення цих білків нівелює теоретичну можливість їх конкурентного зв'язування з іонообмінником. Крім цього, без попереднього видалення нецільових білків при елюції FVIII частина їх може коелювати разом з досліджуваним білком.

До етапу проведення негативної афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з тріазиновими барвниками в ролі лігандів співвідношення FVIII/vWF:R_{cof} зросло відносно вихідного приблизно вдвічі (табл. 1). На етапі проведення хроматографічного очищення FVIII з використанням макропористих кремнеземних сорбентів з тріазиновими барвниками в ролі лігандів воно суттєво не змінилось, що надає нам підставу

вважати, що синтезовані матриці не сорбують vWF. Визначення співвідношення проводили у двох експериментах:

- без попереднього переосадження домішкових білків;
- з етапами попереднього очищення.

Таблиця 1 – Співвідношення FVIII/vWF на різних етапах очищення FVIII

зразки	без попереднього фракціонування	з попереднім фракціонуванням
	FVIII/vWF :R _{cof}	FVIII/vWF :R _{cof}
кріопреципітат	0,75	0,78
елюат з DEAE-Sepharose (0,3 M NaCl)	1,72	1,85
елюат Діасорб-Активний алий 4ЖТ	1,89	1,73
елюат Діасорб-ProcionblueHB	1,75	1,75
елюат Діасорб-Prociongelb M4R	1,73	1,89
елюат Діасорб-ProcionblueMXR	1,8	1,96
елюат Діасорб-Активний яскраво-голубий К	1,68	1,78

Для елюції фактора з DEAE-Sepharose ми використали буфер з 0,3 M NaCl, щоб забезпечити коелюцію комплексу FVIII-vWF. Однак, частина vWF елюювалася з першими фракціями (до виходу FVIII). Відповідно, в основній фракції, що містила FVIII зменшилась кількість vWF і, як наслідок, зросло співвідношення FVIII/vWF:R_{cof}.

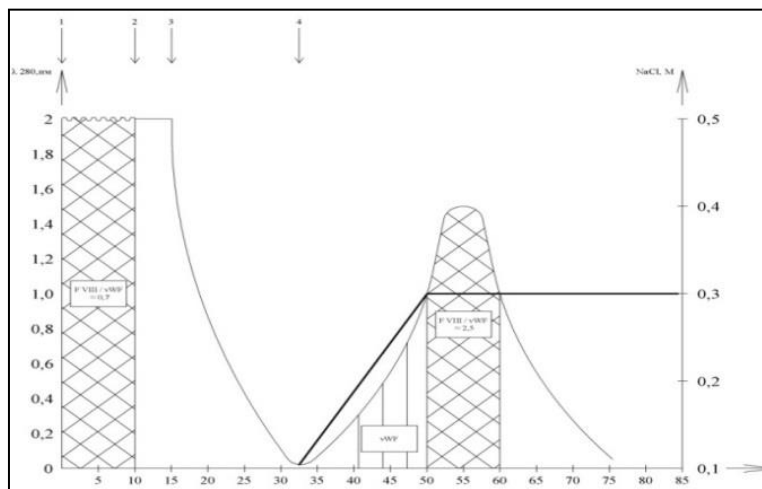


Рис. 3. Іонообмінна хроматографія FVIII/vWF на DEAE-Sepharose

***примітка:** 1 – нанесення; 2 – проскок; 3 – промив; 4 – елюція

На етапі проведення негативної афінної хроматографії, оскільки жоден з цих факторів не сорбується із сорбентами, співвідношення між ними залишається сталим. Отже, використання макропористих кремнеземних сорбентів з тріазиновими барвниками забезпечує не лише зростання питомої активності FVIII, але й не змінює співвідношення $FVIII/vWF:R_{cof}$, яке суттєво змінюється на етапі проведення іонообмінної хроматографії.

Встановлено, що основні втрати від вихідної активності FVIII (до 24 %) відбувались на етапі іонообмінної хроматографії. Оскільки очищення антигемофільного фактора на кремнеземних сорбентах відбувалось завдяки явищу негативної афінної сорбції втрати від активності на цьому етапі є незначними (3,7 %), що є ще одним ваговим аргументом застосування даного методу в технології отримання очищеного препарату.

Висновки

Розроблений нами метод очищення FVIII зсідання крові на макропористих кремнеземних сорбентах з тріазиновими барвниками в ролі лігандів має низку переваг над розповсюдженими методами іонообмінної хроматографії у технології отримання антигемофільного препарату.

Оскільки очищення комплексу FVIII-vWF відбувалось завдяки явищу негативної афінної сорбції, вихід продукту на етапі афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками становить 96,32 %, а також зберігається початкове співвідношення $FVIII/vWF:R_{cof}$.

Література

1. Выделение комплекса FVIII/фактора Виллебранда из плазмы донорской крови/ О. Г. Кутюрова, Т. Л. Дереза, И. А. Скрылева, А. Л. Берковский // Гематология и трансфузиология. – 2014. – № 4 (59). – С. 19– 24.

2. Пат. 107509 UA, C07K 1/22, C07K 14/755, B01D 15/18. Спосіб виділення фактора VIII згортання крові / Шурко Н. О., Даниш Т. В., Новак В. Л. – № u201512302, заявлено 11.12.2015; опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11.

3. Шурко Н.О. Створення технології отримання фактора VIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах / Н. О. Шурко, Т. В. Даниш // Біологія тварин. – 2016. –18 (2). – С.152–159.

4. Cheng E. Purification of coagulation factor VIII by liquid chromatography / E. Cheng // J Blood Disord Transfus. – 2016.– 7:4 (Suppl). –P. 82.

5. Federici A. B. Highly purified VWF/FVIII concentrates in the treatment and prophylaxis of the von Willebrand disease: the PRO.WILL Study / A.B. Federici // Haemophilia. – 2007. – 13(5). – P.15–24.

6. Hashimoto N. A method for systematic purification from bovine plasma of six vitamin K-dependent coagulation factors: Prothrombin, Factor X, Factor IX, Protein S, Protein C, and Protein Z / N. Hashimoto, T. Morita, S. Iwanaga // J. Biochem. – 1985. – V.97. – P. 1347–1355.

7. Mannucci P. M. Drug Therapy: Treatment of von Willebrand disease / P. M. Mannucci // N. Engl. J. Med. –2004. – 351 (7). –P. 683–694.

8. In vitro reactivity of factor VIII inhibitors with von Willebrand factor in different commercial factor VIII concentrates / [G. Tagariello, D. Zanotto, P. Radossiet [et al.] // Am. J. Haematol. – 2007. – 82 (6). – P. 460– 462.

9. Shurko N. Technological scheme for the preparation of purification factor VIII coagulation / N. Shurko, T. Danysh // International Journal of laboratory Hematology. – 2017. – Vol. 39 (Issue S2). – P. 109.

Надійшла 03.11.2017 року.