



# Медицинский вестник ЮГА РОССИИ



Материалы I Конференции  
детских онкологов/гематологов  
Юга России

## «Актуальные проблемы детской онкологии/гематологии»

КУЦЕВ С.И., МОРДАНОВ С.В., ЗЕЛЬЦЕР А.Н., ОКСЕНЮК О.С.,  
УСТАЕВА О.А., КУНГУРОВА Т.И., БУРНАШЕВА Е.В.,  
ГРАНКИНА Е., ШАТОХИН Ю.В.

*Механизмы резистентности к терапии хронического миелолейкоза  
ингибитором тирозинкиназ иматинибом*

ПАВЛЕНКО В.Л., АСЛАНЯН К.С., ЗОТОВА В.В., ВАСИЛЬЕВА Е.В.  
*Онкогематологический центр г.узд «областная детская больница»  
г. Ростова-на-Дону: 18-летний опыт работы*

САВИСЬКО А.А., ШЕСТОПАЛОВ А.В., ТЕПЛЯКОВА Е.Д.,  
АСЛАНЯН К.С., ТАРАСОВА Н.Е., ПАРМОН С.П.  
*Развитие диастолической дисфункции миокарда у детей с острым  
лимфобластным лейкозом на этапах полихимиотерапии*

РУМЯНЦЕВ С.А., МАЙОРОВА О.А., ЗИМИНА Н.Н.,  
ЯКОВЛЕВА М.В., КУРЦЕР М.А.  
*Влияние анте- и интранатальных факторов на формирование клеточного  
состава пуповинной крови доношенных новорожденных*

ОПАЛЕВА Н.В., ПОЛЕВИЧЕНКО Е.В., АСЛАНЯН К.С.,  
ЗОТОВА В.В., ЕФРЕМОВА Е.Ф., ОРЕШКИНА Л.Д.,  
ХАСПЕКЯН А.Х., ЯЦЕНКО И.В., ВАСИЛЬЕВА Е.В. И ДР.  
*Алгоритм проведения вакцинопрофилактики вирусного гепатита в у детей  
с острым лимфобластным лейкозом в динамике программной терапии*

**Главный редактор**

заслуженный врач РФ, проф. Сависько А.А.

**Члены редакционной коллегии:**

Проф. Амбалов Ю.М.  
Д.м.н. Беловолова Р.А.  
Проф. Дерижанова И.С.  
Д.м.н. Дударев И.В.  
Д.м.н. Елисеев Д.Н.  
Проф. Женило В.М.  
Проф. Коган М.И.  
Проф. Кондратенко Т.А.  
Проф. Макляков Ю.С.  
Проф. Микашинович З.И.  
Проф. Овсянников В.Г.  
Проф. Полевиченко Е.В.  
Проф. Сизякина Л.П.  
Проф. Терентьев В.П.  
Проф. Харламов Е.В.  
Проф. Хлопонин П.А.

Д.м.н. Батюшин М.М. (зам. гл. редактора)  
Проф. Волков А.Г.  
Проф. Дроботя Н.В.  
Доц. Епихин А.Н.  
Проф. Кастанаян А.А.  
Проф. Квасов А.Р.  
Доц. Куцев С.И.  
Д.м.н. Набока Ю.Л. (ответственный редактор)  
Проф. Новгородский С.В.  
Д.м.н. Рымашевский А.Н.  
Проф. Сикилинда В.Д.  
Проф. Хананашвили Я.А.  
Д.м.н. Харсеева Г.Г.  
Д.м.н. Чаплыгина Е.В.  
Проф. Черкасов М.Ф.

**Редакционный совет:**

Академик РАЕН и РАМН, проф. Бондаренко В.М.  
Проф. Галимзянов Х.М.  
Академик РАМН, проф. Гинтер Е.К.  
Проф. Линде В.А.  
Член-корр. РАМН, проф. Лоран О.Б.  
Академик РАМН, проф. Мухин Н.А.  
Проф. Поляев Б.А.  
Академик РАЕН, член-корр. РАМН, проф. Румянцев А.Г.  
Проф. Царегородцев А.Д.  
Академик РАН, РАМН, проф. Сидоренко Ю.С.

Член-корр. РАМН, проф. Брико Н.И.  
Проф. Гатагонова Т.М.  
Проф. Долгих В.Т.  
Проф. Ломов Ю.М.  
Проф. Муравьева В.Н.  
Проф. Петров В.И.  
Проф. Радзинский В.Е.  
Доц. Фомин В.В.  
Проф. Галенко-Ярошевский П.А.  
Проф. Кит О.И.

**Технический редактор**

к.б.н. Боканёва С.А.

**Технический секретарь**

Богданова Д.П.

Материалы представленных статей рецензируются согласно требованиям к публикациям, регламентированным ВАК

Всю корреспонденцию направлять по адресу:  
344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29  
Редакция журнала  
«Медицинский вестник Юга России»  
E-mail: rostgmu-journal@rambler.ru

Отпечатан в учебной типографии  
ГОУ ВПО «РостГМУ Росздравица» 2010 г.

Подписано в печать 25.10.2010 г.  
Тираж 500

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС 77-42300 от 8 октября 2010 г.

©Редакционно-издательский отдел «ГОУ ВПО РостГМУ», 2010

*Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть преобразована в электронный вид, либо воспроизведена любым способом без предварительного согласования с издателем.*

# Содержание:

## Обзоры

- **Ипатов С.Е., Румянцев С.А.**  
Основы безопасности генной терапии  
**Ipatov S.E., Roumiantsev S.A.**  
Basis of Gene Therapy .....4–9
- **Куцев С.И., Морданов С.В., Зельцер А.Н., Оксенюк О.С., Устаева О.А., Кунгурова Т.И., Бурнашева Е.В., Гранкина Е., Шатохин Ю.В.**  
Механизмы резистентности к терапии хронического миелолейкоза ингибитором тирозинкиназ иматинибом  
**Kutsev S.I., Mordanov S.V., Zeltser A.N., Oxenjuk O.S., Ustaeva O.A., Kungurova T.I., Burnasheva E.V., Grankina E., Shatokhin Yu.V.**  
The Mechanisms of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib Therapy of Chronic Myeloid Leukemia.....10–17

## Оригинальные статьи

- **Румянцев С.А., Майорова О.А., Зимина Н.Н., Яковлева М.В., Курцер М.А.**  
Влияние ante- и интранатальных факторов на формирование клеточного состава пуповинной крови доношенных новорожденных  
**Roumiantsev S.A., Mayorova O.A., Zimina N.N., Yakovleva M.V., Kurtser M.A.**  
Influence of an Ante- and Intranatal Factors on Cord Blood Cell Composition of Fullterm Newborns ..... 18–25
- **Ибрагимов Р.Ш., Райкина Е.В., Осипова Е.Ю., Майорова О.А., Яковлева М.В., Румянцев С.А.**  
Клеточный состав трансплантационного материала пуповинной и Г-КСФ мобилизованной периферической крови  
**Ibragimov R.Sh., Raikina E.V., Osipova E.Yu., Maierova O.A., Yakovleva M.V., Roumiantsev S.A.**  
Cell Composition of Cord Blood and G-Scf-Mobilized Blood Transplantational Material ..... 26–34
- **Сависько А.А., Шестопалов А.В., Теплякова Е.Д., Асланян К.С., Тарасова Н.Е., Пармон С.П.**  
Развитие диастолической дисфункции миокарда у детей с острым лимфобластным лейкозом на этапах полихимиотерапии  
**Savisko A.A., Shestopalov A.V., Tepljakova E.D., Aslanyan K.S., Tarasova N.E., Parmon S.P.**  
Development Diastolic Dysfunction Myocardium in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia at the Stages of the Polychemotherapy .....35–37
- **Бгане Н.М., Трембач А.В.**  
Применение рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови при резистентных коагулопатиях у детей с сепсисом  
**Bgane N., Trembach A.**  
Application of Recombinant VII Activated Coagulation Factor for Children with Resistant Coagulopathy Caused Sepsis.....38–40
- **Опалева Н.В., Полевиченко Е.В., Асланян К.С., Зотова В.В., Ефремова Е.Ф., Орешкина Л.Д., Хаспекян А.Х., Яценко И.В., Васильева Е.В., Гончарова Л.В., Краснянская Н.В., Голованова Н.А., Мариина Н.В., Огинская Н.Г., Курузян Т.Г., Еркина Г.В., Калинина Т.Н., Шайхутдинова А.М.**  
Алгоритм проведения вакцинопрофилактики вирусного гепатита В у детей с острым лимфобластным лейкозом в динамике программной терапии  
**Opaleva N.V., Polevichenko E.V., Aslanyan K.S., Zotova V.V., Efremova E.F., Oreshkina L.D., Haspekyan A.H., Yachenko I.V., Vasilieva E.V., Goncharova L.V., Krasnyanskaya N.V., Golovanova N.A., Mariina N.V., Oginskaya N.G., Kuruzyan T.G., Erkina G.V., Kalinina T.N., Shaihutdinova A.M.**  
Algorithm of Hepatitis B Vaccinal Prevention at Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Dynamics of Program Therapy .....41–45
- **Росторгуев Э.Е., Григоров С.В.**  
Модель ранней диагностики опухолей у детей  
**Rostorguev E.E., Grigorov S.V.**  
Pattern of Children's Tumors Early Detection ..... 46–49
- **Пухтинская М.Г., Эстрин В.В.**  
Профилактика бактериальных осложнений у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом человеческим рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором  
**Puchtinskaya M.G., Estrin V.V.**  
Preventive Maintenance of Bacterial Complications at Newborns with the Respiratory Distress-Syndrome by Human Recombinant granulocyte Colony-Stimulating Factor .....50–53
- **Ледяев М.Я., Степанова О.В., Шахова Н.В., Мерзлякова Н.А., Скопенко Е.Б.**  
Клинические особенности гемофилии на современном этапе  
**Ledyaev M.Y., Stepanova O.V., Shahova N.V., Merzlyakova N.A., Scopenok E.B.**  
Clinical Characteristics of Hemophilia Today ..... 54–56

► **Козель Ю.Ю., Нестерова Ю.А., Кузнецов С.А., Сиденко Л.Ю., Арсамакова Х.Х.**  
Опыт лечения нейробластом у детей и подростков (по материалам отделения детской онкологии РНИОИ за 2001–2009 годы)

► **Симованьян Э.Н., Сарычев А.М., Денисенко В.Б., Григорян А.В.**  
Лимфопролиферативный синдром в практике педиатра-инфекциониста

► **Козель Ю.Ю., Качесова П.С., Горошинская И.А., Сиденко Л.Ю., Нескубина И.А., Ушакова Н.Д., Нестерова Ю.А., Кузнецов С.А.**  
Влияние аутоплазмохимииотерапии с предварительной экстракорпоральной детоксикацией аутоплазмы на показатели эндогенной интоксикации у детей со злокачественными опухолями костей

► **И.И. Бабич, О.В. Короткова, К.Н. Чардаров, К.С. Асланян**  
Современные аспекты хирургического лечения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры у детей

#### Случай из практики

► **В.В. Зотова, О.С. Селезнева, К.С. Асланян, Е.В. Васильева, А.Э. Мационис, Н.А. Миханюшина**  
Первичная кожная Т-клеточная лимфома у ребенка 3-х месяцев

► **Лазарев В.В., Албегова Б.З., Гамиева Е.В., Гусоева И.Г.**  
Случай висцерального лейшманиоза у ребенка, проживающего в Северной Осетии

#### Обмен опытом

► **Козель Ю.Ю., Кузнецов С.А.**  
Рак носоглотки у детей и подростков: опыт лечения в отделении детской онкологии РНИОИ

► **Павленко В.Л., Асланян К.С., Зотова В.В., Васильева Е.В.**  
Онкогематологический центр ГУЗ «Областная детская больница» г.Ростова-на-Дону: 18-летний опыт работы

► **Ткаченко А.Е., Сафонова С.А., Пунанов Ю.А., Придвижкин С.И., Овсянникова П.Е., Воробьева Л.А., Товпыга В.Г., Шаргородская О.А.**  
Опыт организации работы первого в России детского хосписа в Санкт-Петербурге

► **Шатохин Ю.В., Снежко И.В., Гончарова З.А., Докучаев С.Е., Фомина-Чертоусова Н.А.**  
Клинико-лабораторная характеристика фуникулярного миелоза

► **Коновалова М.В., Вашура А.Ю., Литвинов Д.В., Скоробогатова Е.В., Филиппова Н.Е., Бельмер С.В., Цейтлин Г.Я.**  
Изучение энергетического обмена у детей с онкологическими заболеваниями

**Kozel Yu.Yu., Nesterova Yu.A., Kuznetsov S.A., Sidenko L.Yu., Arsamakova H.H.**  
Experience of Neuroblastoma Treatment in Children and Teenagers (Materials of Pediatric Oncology Department of Rostov Cancer Research Institute for 2001–2009) ..... 57–61

**Simovanyan E.N., Sarychev A.M., Denisenko V.B., Grigoryan A.V.**  
Lymphoproliferative Syndrome in Pediatric and Infectiologist Practice .....62–66

**Yu.Yu.Kozel, P.S.Kachesova, I.A.Goroshinskaya, L.Yu.Sidenko, I.A.Neskubina, N.D.Ushakova, Yu.A.Nesterova, S.A.Kuznetsov.**  
Influence of Autoplasmochemotherapy with Preliminary Extracorporeal Detoxication of Autoplasma on Parameters of Endogenic Intoxication in Children with Malignant Bone Tumours..... 67–70

**Babich I.I., Korotkova O.V., Chardarov K.N., Aslanyan K.S.**  
Modern Aspects of the Surgical Treatment of Children with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura ..... 71–73

**Zotova V.V., Selezneva J.S., Aslanjan K.S., Vasiljeva E.V., Machionis A.E., Mihanoshina N.A.**  
Primary T-Cell Cutaneous Lymphoma at Three-Month-Old Child .....74–76

**Lazarev V.V., Albegova B.Z., Gamieva E.V., Gussoeva I.G.**  
A Case of Visceral Leishmaniasis at the Child from North Osetia .....77–79

**Yu.Yu.Kozel, S.A.Kuznetsov**  
Cancer of nasopharynx in children: experience of treatment at Pediatric Oncology Department of Rostov Cancer Research Institute .....80–81

**Pavlenko V.L., Aslanyan K.S., Zotova V.V., Vasilieva E.V.**  
Center of Oncology and Hematology of Rostov Regional Children's Hospital: 18-Years Experience of Work .....82–84

**Tkachenko A.E., Safonova S.A., Punanov Yu.A., Pridvizhkin S.I., Ovsyanniova P.E., Vorobyova L.A., Tovpyga V.G., Shargorodskaya O.A.**  
Saint-Petersburg Experience of the First Russian Pediatric Hospice Organization .....85–86

**Yu.V. Shatohin, I.V. Snezhko, Z.A. Goncharova, S.E. Dokuchaev, N.A. Fomina-Chertousova**  
To the problem of essential early diagnostics of funicular myelosis ..... 87–89

**Konovvalova M.V., Vashura A.Yu., Litvinov D.V., Skorobogatova E.V., 3Filippova N.E., Belmer S.V., Tseitlin G.Ya.**  
Energetic metabolism studies in pediatric cancer patients .....90–93



Ипатов С.Е., Румянцев С.А.

## ОСНОВЫ БЕЗОПАСНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии Минздрава России

Россия, 117997, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117/2. E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru

К настоящему времени в научных кругах всего мира обсуждаются проблемы безопасности при проведении генной терапии у широкой категории пациентов. В данном обзоре суммированы результаты клинических исследований, приведены пояснения относительно побочных эффектов, связанных с генотоксичностью векторной интеграции, обсуждаются факторы, которые могут вызывать случаи генотоксичности, а также предложены подходы, способные сохранить или повысить клиническую эффективность генной терапии с использованием в качестве мишеней гемопоэтических стволовых клеток, при этом существенно снижая риск развития лейкемии и других побочных эффектов, связанных с включением вектора в геном.

*Ключевые слова:* генная терапия, генетические векторы

Ipatov S.E., Roumiantsev S.A.

## BASIS OF GENE THERAPY

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,  
117/2 Leninskiyi pr., Moscow. 117997, Russia. E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru

By present time safety problems of gene therapy are widely discussed among scientists of all world. In this review results of clinical researches are summarized; explanations concerning side effects of vectors integration are given; factors that can cause genotoxicity are discussed. Approaches which can save or increase clinical efficacy of gene therapy with use as targets hematopoietic stem cells, thus significantly reduced risk of leukemia development and other side effects related to vectors including in genome, are presented.

*Keywords:* Gene therapy, genetic vectors

Прошло уже более двух десятилетий с того времени, когда нереплицирующиеся вирусные векторы были впервые использованы для генетической модификации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) мышей, и более 15 лет с начала первого этапа клинических испытаний данной стратегии у человека. Эти испытания продемонстрировали не много фактов успешной модификации ГСК, потому исследователи, руководствуясь указаниями специальной экспертной комиссии Национального Института здоровья США 1996 года, с участием других финансирующих организаций, сфокусировали свои усилия на усовершенствовании векторов, более подробном изучении заболеваний – объектов генной терапии, и усовершенствовании методов отбора и культивирования ГСК *ex vivo*. Использование в качестве моделей приматов, собак и иммунодефицитных мышей вместо классических мышинных моделей позволило создать методологические подходы и векторы, которые могли бы непосредственно и успешно использоваться в клинических исследованиях. Недавно также были описаны важные факторы относительно проведения генной терапии, такие как использование фибропектинового матрикса для концентрации векторов, прилежащих к ГСК в процессе предотвращения их дифференцирования, включение цитокинов, таких как лиганд *flt3*, тромбопоэтин и фактор стволовых клеток в трансдуцируемых культурах, а также использование нетоксических кондиционирующих режимов перед инфузией большого количества модифицированных *ex vivo* CD34+ клеток [1]. Эти усилия

привели к появлению второй волны клинических испытаний генной терапии в конце 1990-х и начале 2000 годов, во время которых впервые были достигнуты явные клинические эффекты, особенно у пациентов с тяжелыми генетически детерминированными иммунодефицитными заболеваниями [2-4]. Однако в 2003 году поступило сообщение о первом серьезном побочном эффекте, связанном с генетической модификацией ГСК трансфицированных ретровирусными векторами [5-6]. В данном обзоре суммированы обнадеживающие результаты этих клинических исследований, приведены пояснения относительно побочных эффектов, связанных с генотоксичностью векторной интеграции, обсуждаются факторы, которые могут вызывать случаи генотоксичности, а также предложены подходы, которые могут сохранить или повысить клиническую эффективность генной терапии с задействованием гемопоэтических клеток-мишеней, при этом существенно снижая риск развития лейкемии и других побочных эффектов, связанных с включением вектора в геном.

### Использование нереплицирующихся вирусных векторов для модификации гемопоэтических стволовых клеток: обнадеживающие результаты клинических испытаний

В 1999 году группа исследователей под руководством иммунолога Алана Фишера и Марии Каваццано-Кальво в госпитале Некер в Париже начала проводить клинические



испытания генной терапии у мальчиков с X-сцепленной тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (X-ТКИН). У пациентов с X-ТКИН отмечается глубокая дисфункция иммунной системы, которая является результатом мутаций  $\gamma$ -компонента субъединицы рецептора цитокина, необходимого для формирования ответа к интерлейкинам (IL) 2, IL4, IL7, IL9 и другим цитокинам, которые в свою очередь необходимы для пролиферации, созревания и функционирования клеточных компонентов иммунной системы. У пациентов с X-ТКИН полностью отсутствуют Т-клетки и NK-клетки, отмечается глубокая дисфункция В-клеток. Если таким детям не проведена аллогенная трансплантация стволовых клеток, то они неизменно погибают в раннем детстве. При отсутствии совместимого донора пациенту может быть выполнена гаплоидентичная трансплантация, но ее исходы обычно неблагоприятны.

У пациентов с X-ТКИН были взяты CD34+ клетки аутологичного костного мозга, культивированы в присутствии стандартного ретровирусного вектора, продуцирующего  $\gamma$  трансген, и реинфузированы без аблативного кондиционирования. У 10 из 11 пациентов, участвовавших в исследовании, произошло быстрое и устойчивое восполнение количества Т и В клеток и восстановление В-клеточных функций [7,8]. Все Т-клетки содержали и продуцировали  $\gamma$ -трансген вектора в отличие от В-клеток и клеток миелоидного ростка, у которых этот эффект наблюдался с гораздо меньшей частотой. Это было неувидительно, так как до трансплантации пациентам не проводили миелоаблативное кондиционирование, а, в отличие от Т-клеточной популяции, у генетически модифицированных клеток нет селективного преимущества для В-клеток и клеток миелоидной линии. В течение нескольких месяцев эти пациенты прекратили принимать antimicrobные препараты и продемонстрировали ответ на применение вакцин. Они демонстрировали многообразие форм Т-клеток, как показывали Т-клеточные рецепторы (TCR), содержащие множество сайтов внедрения векторов. Несколькими годами позже в Великобритании в госпитале Great Ormond Street было начато второе исследование по лечению X-ТКИН, которое также показало очень обнадеживающие результаты. Это исследование имело такой же дизайн подбора пациентов, применялись CD34+ клетки – мишени костного мозга и те же векторные структуры для переноса генов, но имелись небольшие различия в условиях содержания трансдуцированной культуры клеток [4].

Вторым врожденным синдромом иммунодефицита, успешно пролеченным с использованием генетически модифицированных ГСК, был дефицит аденозиндезаминазы (АДА). При этом заболевании количество и функции Т-, В- и NK-клеток снижено в связи с недостатком фермента АДА, который предотвращает аккумуляцию метаболитических токсинов в лимфоидных клетках. Для этих пациентов также характерно многообразие различных неиммунных метаболитических отклонений, которые неблагоприятно отражаются на росте и развитии ребенка и качестве его жизни. Несколько исследований по оценке возможности использования генной терапии были проведены в начале 1990-х годов, когда пациентам вводили аутологичные лимфоциты или CD34+ клетки, модифицированные с помощью ретровирусных векторов, снабженных геном АДА. Но при этом наблюдалась недоста-

точная трансгенная экспрессия, низкая приживаемость генетически модифицированных клеток. Также у этих пациентов продолжали проводить заместительную терапию АДА, что в целом привело к недостатку видимых клинических преимуществ генной терапии [9-11]. В отличие от X-ТКИН, трансдуцированные CD34+ клетки не приживались на том уровне, который мог бы повлечь за собой клинические преимущества в том случае, если до начала трансплантации не проводилась миелосупрессивная терапия. Исследователи из Милана сообщали о том, что лечение бусульфаном в умеренных дозах до инфузии трансдуцированных ретровирусом аутологичных CD34+ клеток хорошо переносилось пациентами и приводило к стабильной экспрессии гена АДА с восстановлением количества Т-клеток и нормализации иммунной функции [3]. Эти пациенты не получали ферментативную заместительную терапию PEG-АДА (пэгелированный-АДА), что благоприятно отразилось на выживании и экспансии модифицированных Т-клеток.

#### **Побочные реакции, связанные с трансдукцией векторов**

Оптимизм, связанный с обнадеживающими результатами клинических исследований, резко уменьшился в конце 2002 года, когда через 3 года после трансплантации генетически модифицированных CD34+ клеток у 2 мальчиков из первого клинического испытания по лечению X-ТКИН развился Т-клеточный лейкоз [6]. У обоих пациентов анаплазированные Т-клетки были клональными и содержали интегрированный вектор в первом интроне гена Lmo2, а у второго - немного выше этого же локуса, которые кодирует транскрипцию фактора Ромботин-2Б, необходимого для развития лимфатической ткани. Этот фактор активируется хромосомными транслокациями в некоторых случаях спонтанных Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) человека [12]. mPНК Ромботина-2 выделялась из большого количества лейкозных клеток, что сочеталось с присутствием продуцирующего Ромботин-2 Lmo2 аллеля, содержащего векторные вставки. В то же время  $\gamma$ -трансген оставался не мутировавшим и определялся в нормальных количествах, а IL2R не имел признаков аномальной активности в опухолевых клетках. Позже исследователи показали, что еще у двух пациентов, участвовавших в исследовании, развилась Т-клеточная пролиферация более чем через 3 года после трансплантации, хотя подробности этих случаев с молекулярной точки зрения еще не опубликованы [7]. Все пациенты с лейкозом после генной терапии были восприимчивы к химиотерапии и вышли в ремиссию, но 1 пациент умер после аллогенной трансплантации стволовых клеток от совместимого неродственного донора, предпринятой для лечения рецидива заболевания.

Тот факт, что вектор-индуцированные лейкозы возникали только у пациентов с X-ТКИН, а не при других видах иммунодефицитов, получавших CD34+ клетки, модифицированные ретровирусным вектором, послужило толчком к изучению роли специфических факторов при X-ТКИН в развитии этого побочного эффекта. Возник вопрос: все ли пациенты, получившие аутологичные CD34+ клетки или другие клетки, модифицированные интеграцией ретровируса, находятся в группе риска или только пациенты с X-ТКИН? Ответ имеет важные последствия



для дальнейшего клинического развития генной терапии с интегрированными векторами. Обнаружение того факта, что оба гена,  $\text{c}\mu$  и  $\text{Lmo2}$ , были одновременно активированы при Т-клеточной лимфоме мышей, которая развивалась после инфицирования мышей реплицирующимся ретровирусом, может свидетельствовать о существовании уникальной связи между этими генами, когда они aberrантно активируются вирусными энхансерами [13]. В одном из исследований гиперпродукция  $\text{c}\mu$ -трансгена в клетках костного мозга мышей привела к высокой частоте Т-клеточного лейкоза, однако эти результаты были неоднозначными, и другими исследованиями не подтвердились [14,15]. В основном уровень продукции  $\text{c}\mu$ -трансгена и сигналы, подаваемые зрелым Т-клеткам, находились в пределах нормы у пациентов с Х-ТКИН, получавших генную терапию. Однако представляется возможным, что частичная экспрессия трансгена, имевшая место во время эволюции Т-клеток, могла принять участие в последующем aberrантном поведении этих клеток. Вторым важным фактором, который повышает риск развития мутаций в дальнейшем и, в конечном итоге, лейкемии у пациентов с Х-ТКИН, может быть очень быстрая экспансия Т-клеток после трансдукции предшественников Т-клеток, созревание которых было заблокировано.

#### Генотоксичность трансдуцированных ретровирусов

Вирусологи и исследователи в сфере генной терапии были обеспокоены проблемой потенциальной генотоксичности и риска лейкемогенеза, ассоциированного с трансфецированными ретровирусами, с тех пор, как они были созданы в качестве векторов для переноса генов. Известно несколько механизмов, посредством которых интегрированная провирусная ДНК ретровируса может быть онкогенной, путем позитивной регуляции экспрессии смежных протоонкогенов сильными энхансерами и промоторами вируса, или инактивацией генов репрессии опухоли путем разрыва экзона или элементов позитивной регуляции. Стандартные ретровирусные векторы изначально получают из вируса лейкемии мышей Молони (MLV). Реплицирующийся дикий тип штамма данного вируса индуцирует тимические лимфомы у восприимчивых новорожденных мышей, несмотря на отсутствие онкогена в закодированной последовательности вирусного генома. Опухоли возникают только у мышей, инфицированных реплицирующимся вирусом дикого типа в процессе активного развития тимуса. Каждая опухоль имеет большое количество трансфецированных тел вируса, и исследователи предположили, что повторная интеграция провирусов MLV в геном предшественников Т-клеток в тимусе может привести к активации протоонкогенов. Определенные протоонкогены, такие как  $\text{rim}$  и  $\text{muc}$ , оказались сайтами повторной трансфекции в данных лимфомах. В 1992 году, Т-клеточная лимфома была диагностирована у 3-х макак резус, получивших трансплантаты аутологичных CD34+ клеток, трансдуцированных с помощью вектора MLV, зараженного реплицирующимися телами рекомбинантного вируса [16]. Данные опухоли содержали большое количество инсерций провируса, однако, развития опухолей, связанных с применением реплицирующихся векторов, в первые 15 лет их использования для трансдукции гемопоэтических стволовых клеток ни у мышей, ни у человекоподобных приматов или пациентов

отмечено не было. Поэтому было сделано предположение, что уровень вирусности трансдуцированных векторов приводит к небольшому количеству анаплазированных клеток, адекватно выбраковывающихся иммунной системой. Размер генома млекопитающих, мультифакторная теория возникновения рака и ранние исследования, выполненные до того, как была расшифрована полная последовательность генома мышей и человека, подтверждающая случайную интеграцию MLV, были дополнительными факторами, служащими для подтверждения очень низкого риска лейкемогенеза при применении дефектных в отношении репликации вирусных векторов [17].

Расшифровка полной последовательности генома человека и мышей и создание основанной на ПЦР (полимеразная цепная реакция) методологии определения большого числа сайтов интеграции провирусов привели к пересмотру имеющихся эталонов в осуществлении интеграции провирусов. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и векторные системы на основе ВИЧ преимущественно интегрируются в активно экспрессируемые гены линий Т-клеток, векторные системы на основе MLV (вирус лейкемии мышей) преимущественно интегрируются в зоне 5' сайтов старта транскрипции генов в линиях фибробластов [18, 19]. Данные системы значительно более предсказуемы в отношении повышенного риска нарушения экспрессии генов после трансфекции вектора, по сравнению со случайной интеграцией.

Группа Hematti P. выполнила широкомасштабный анализ сайтов интеграции в гранулоцитах и лимфоцитах, образовавшихся после предварительного приживления трансдуцированных ретровирусом и лентивирусом CD34+ клеток у макак резус в течение от нескольких месяцев до нескольких лет [20]. Векторы на основе вируса MLV и вируса иммунодефицита обезьяны (ВИО) были внедрены в соответствующие гены или вблизи них, при этом инсерция ВИО распространилась по всей длине гена, а инсерция MLV сконцентрировалась возле сайтов старта транскрипции. Проведенный в последнее время обширный анализ интеграции при исследовании генной терапии при Х-сцепленном ТКИН и дефиците АДА (аденозиндеаминазы) выявил подобные данные и для MLV векторов [21-23]. В таблице 1 приведены имеющиеся в настоящее время данные относительно механизмов интеграции данных и других систем переноса генов. Данная информация подтверждает то, что каждый вирус взаимодействует с различными клеточными кофакторами при интеграции в ДНК.

Большой набор данных относительно сайтов интеграции мышей, не человекоподобных приматов и людей, используемый при проведении клинических исследований, также продемонстрировал убедительные доказательства влияния специфических интеграций на выживание, приживления и/или пролиферацию трансдуцированных примитивных клеток-предшественников гемопоэза, даже при отсутствии лейкемической трансформации. Основываясь на размере генома и количестве определяемых сайтов интеграции, обнаружение более чем одной независимой интеграции векторной системы в конкретном гене или расположенной в зоне в пределах 30-100 kb относительно друг друга получило название «общие сайты интеграции» (CIS) и, при обнаружении в независимых опухолях на моделях с использованием реплицирующейся векторной системы, представляется как причина развития опухоли [24].



Механизмы интеграции и генотоксичность различных векторных систем

Векторная система	Избирательная интеграция	Связанные с вектором клональные эффекты
MLV ретровирус	Последовательности генов, сайты старта транскрипции (TSS), экспрессируемые гены [19,20]	T-клеточные лейкомии при испытаниях при ТКИД-Х, острая миелоидная лейкемия у резус-макак, опухоли системы гемопоэза у мышей [6,26,33]
ВИЧ или ВИО лентивирус	Последовательности генов, экспрессируемые гены, ассоциированные с транскрипцией модификации гистонов [18,37,41]	Небольшая частота по сравнению с MLV при испытаниях SGK (стволовые гемопоэтические клетки) моделей склонных к возникновению опухолей мышей
EIAV лентивирус	Последовательности генов, активно экспрессируемые гены [42]	Опухоли печени после введения новорожденным [43]
«Пенящийся вирус» человека	Нет избирательности в отношении экспрессируемых генов, избирательность к островку CpG	Нет данных
Вирус саркомы птиц, вирус лейкоза	Небольшая избирательность в отношении активных генов, нет избирательности к TSS [37]	Нет данных
Интеграза фага φ31	Избирательность в отношении псевдо-att сайтов [40]	Нет данных
Транспозон «Спящей красавицы»	Небольшая избирательность в отношении генов и избирательность к TSS в микросателлитных регионах [44]	Нет данных
Нуклеазы цинковых пальцев	Специфические последовательности, избираемые цинковыми пальцами [39]	Нет данных
Адено-ассоциированный вирус	Интеграция в «горячие точки», активные гены, островки CpG, TSS [45]	Опухоли печени, сомнительно [46,47]

Большой набор данных относительно сайтов интеграции мышей, не человекоподобных приматов и людей, используемый при проведении клинических исследований, также продемонстрировал убедительные доказательства влияния специфических интеграций на выживание, приживления и/или пролиферацию трансдуцированных примитивных клеток-предшественников гемопоэза, даже при отсутствии лейкемической трансформации. Основываясь на размере генома и количестве определяемых сайтов интеграции, обнаружение более чем одной независимой интеграции векторной системы в конкретном гене или расположенной в зоне в пределах 30-100 kb относительно друг друга получило название «общие сайты интеграции» (CIS) и, при обнаружении в независимых опухолях на моделях с использованием реплицирующейся векторной системы, представляется как причина развития опухоли [24].

Проведенный анализ интеграций в гранулоцитах после аутологичной трансплантации MLV-трансдуцированных CD34+ клеток макак резус выявил, что локус Mds1/Evi1 генома встречается в избытке, составляя 2% всех сайтов генетической карты [25]. Данные клоны были обнаружены только в миелоидной линии и до настоящего времени не ассоциировались с развитием лейкемии. Однако привлекает внимание то, что данный локус также являлся сайтом трансфекции вектора у экспериментальной мыши, у которой развилась ассоциированная с реплицирующимся вектором миелоидная опухоль [26].

В последних клинических исследованиях при хроническом гранулематозе (CGD), у 2 пациентов изначально обнаруживался высокий уровень ген-корректированных

гранулоцитов и наблюдалась ликвидация серьезных хронических инфекций [27]. Однако несколько месяцев спустя после трансплантации, уровень ген-корректированных клеток постепенно повысился с 5% до 10% и так далее вплоть до 50%, и данная экспансия происходила за счет клонального доминирования клеток с инсерциями MLV-векторов в регион Mds1/Evi1. У одного пациента прекратилась экспрессия корректирующего трансгена и он умер вследствие инфекции, второй пациент остался в нормальном состоянии, без развития аномального гемопоэза или лейкемии. Первичные клетки костного мозга мышей, трансдуцированные MLV-векторами, культивировались *in vitro*, и несколько недель спустя образовалась линия миелоидных клеток с заблокированной программой апоптоза. Все они содержали инсерцию вектора, активирующую локус гена Mds1/Evi1, тесно связанный гомологичный локус, или расположенный выше, но также активирующий экспрессию Evi1 [28].

Белки, кодируемые генами Evi1 или Mds1/Evi1 альтернативно сплайсированной mРНК, являются факторами транскрипции, обладающими ДНК-связывающей активностью [29]. Их функция еще недостаточно понятна, но имеются сообщения о случаях спонтанных миелоидных лейкозов человека с транслокациями, активирующими этот локус, а гиперэкспрессия Evi1-изоформ является неблагоприятным прогностическим фактором при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) человека [30]. Вместе эти данные свидетельствуют о том, что вставки, которые расположены непосредственно в или около генного комплекса Mds1/Evi1 примитивных гематопоэтических кле-





ток, могут оказывать значительное влияние на поведение клеток, блокируя в миелоидных клетках–предшественниках программу апоптоза или, напротив, снижая их выживаемость [31,32]. Макака резус, которой 5 лет назад была проведена трансплантация ВЛМ-трансдуцированных CD34+ клеток, умерла от ОМЛ, причем в опухолевых клетках была обнаружена векторная активация антиапоптотического гена Bcl2A1 [33]. Создание векторов на основе ВЛМ для клинического применения, мишенью которых являются гемопоэтические стволовые клетки, почти полностью остановилось в 2005 году. В это время исследователи переоценили соотношение риска-выгоды на основании данных о побочных эффектах, выявленных во время исследования у пациентов с Х-ТКИН и появления новых данных об особенностях векторной интеграции и генотоксичности.

### Подходы к снижению риска генотоксичности

В настоящее время разрабатывается ряд модификаций векторных конструкций для снижения риска генотоксичности интегрирующихся вирусных векторов. Судя по всему, у пациентов с ВИЧ-инфекцией не развиваются опухоли, связанные с интеграцией, а в опытах с животными моделями векторы-производные ВИЧ обладали меньшей лейкемогенностью, чем стандартные ретровирусные векторы на основе вируса лейкемии мышей (ВЛМ) [34]. Это, вероятно, является результатом более безопасного вида интеграции, при которой центры интеграции ВИЧ и ВЛМ расположены вдоль генов в отличие от кластерного расположения в начале транскрипции, где активация прилежащего гена является более вероятной [19,20]. При этом векторы, созданные на основе ВИЧ и родственных ему ВЛМ были разработаны на основе удаления большого числа участков элементов-усилителей в длинных концевых повторах на любом конце интегрированных провирусных форм. Этот дизайн (так называемый «самоинактивирующийся») был изначально избран для того, чтобы снизить риск репликации векторной системы с эндогенным ВИЧ у пациентов, получавших трансдуцированные клетки. Такой дизайн конструкции также может обладать дополнительными преимуществами – так как в этом случае снижается вероятность активации прилежащих протоонкогенов. Векторные системы, созданные на основании ВЛМ, также могут быть модифицированы в «самоинактивирующийся» дизайн. Одно исследование показало более низкий риск активации генов роста после трансдукции самоинактивирующихся векторов по сравнению со стандартными MLV векторами [35]. Мощные внутренние промоторы, необходимые для проведения адекватной экспрессии трансгенной конструкции, также могут активировать и прилежащие протоонкогены, так что даже векторы с самоинактивирующимся дизайном могут оказаться генотоксичными посредством актива-

ции или инактивации прилежащих к зоне интеграции генов. Для снижения влияния векторных элементов на окружающий их геном, и наоборот - для того, чтобы защитить экспрессию трансгена от позиционных эффектов, связанных с центром интеграции в векторную конструкцию могут быть добавлены элементы ДНК, известные как «инсуляторы» [36]. Было показано, что несколько других ретровирусов, включая «пенистый вирус человека» и вирус саркомы птиц, обладают более произвольным интеграционным поведением, при котором не поражаются гены и поэтому с меньшей вероятностью активируются прото-онкогены [37,38]. Однако даже произвольное интеграционное поведение может быть ассоциировано с некоторым риском генотоксичности, особенно в ситуациях, когда имеют место множественные векторные вставки в клетки-мишени.

В настоящее время разрабатывается ряд подходов для целенаправленной интеграции в специфические участки генома. Конечной целью является коррекция дефектного гена путем гомологичной рекомбинации. Альтернативой может стать использование интегразы, которая поражает один или более специфичных участков генома, удаленных от протоонкогенов, что может быть безопаснее, чем вирусные векторы, предпочитаемые в настоящее время для трансфекции. Наиболее впечатляет возможность создания нуклеаз «цинковых пальцев», которые прикрепляются к специфическим фрагментам ДНК, окружая последовательность гена, нуждающегося в коррекции, и затем продуцируют двухцепочечные отрезки ДНК, способствуя гомологично-направленному восстановлению. Так в 2005 году исследователи из Сангамо сообщили о коррекции Х-ТКИН дефекта в 7% первичных Т-клеток человека [39].

Бактериофаг φ31 содержит интегразу, которая направляет интеграцию к нескольким специфичным «добавочным» участкам бактериального генома. Chalberg и соавторы сообщают о том, что геном млекопитающих содержит псевдо-добавочные участки, которые используются как объекты предпочтительной интеграции трансгенов, переносимых плазмидами, также содержащими φ31 интеграционный отрезок в присутствии φ31 интегразы [40]. Наибольшей проблемой этого и других подходов использования невирусной интеграции генов является создание эффективного и нетоксичного метода транспорта нового генетического материала в ядро клеток-мишеней. Физические и химические методы в целом являются высокотоксичными по отношению к гемопоэтически клеткам, несмотря на то, что имеют высокую трансгенную эффективность. Токсичными являются и устройства для электропорации CD34+ клеток, изучаемые в условиях *ex vivo*. Для переноса трансгенов, интеграз или нуклеаз в клетки-мишени были созданы неинтегрирующие лентивирусные векторы. Эти подходы являются очень сложными и, по всей видимости, пройдут еще годы до их применения в клинической генной терапии.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Larochelle A, Dunbar CE. Genetic manipulation of hematopoietic stem cells // *Semin Hematol.* – 2004. - №41. – P.257-271.
2. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease // *Science.* – 2000. - №288. – P.669-672.
3. Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning // *Science.* – 2002. - №296. – P.2410-2413.
4. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, et al. Gene therapy of Xlinked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector // *Lancet.* – 2004. - №364. – P.2181-2187.
5. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for Xlinked severe combined immunodeficiency // *N Engl J Med.* - 2003. - №348. – P.255-256.



6. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 // *Science*. – 2003. - №302. – P.415-419.
7. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, de Saint BG, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies // *Immunity*. – 2001. - №15. – P.1-4.
8. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy // *N Engl J Med*. – 2002. - №346. – P.1185-1193.
9. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocytedirected gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years // *Science*. – 1995. - №270. – P.475-480.
10. Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, et al. Engraftment of genemodified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency // *Nat Med*. – 1995. - №1. – P.1017-1023.
11. Kohn DB, Hershfield MS, Carbonaro D, et al. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates // *Nat Med*. – 1998. - №4. – P.775-780.
12. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion // *Mol Ther*. – 2006. - №13. – P.15-25.
13. Dave UP, Jenkins NA, Copeland NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights // *Science*. – 2004. - №303. – P.333.
14. Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von KC, Verma IM. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma // *Nature*. – 2006. - №440. – P.1123.
15. Thrasher AJ, Gaspar HB, Baum C, et al. Gene therapy: XSCID transgene leukemogenicity // *Nature*. – 2006. - №443. – P.E5-E6.
16. Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer // *J Exp Med*. – 1992. - №176. – P.1125-1135.
17. Cornetta K, Morgan RA, Anderson WF. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer to humans // *Hum Gene Ther*. – 1991. - №2. – P.5-14.
18. Schroder AR, Shinn P, Chen H, et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots // *Cell*. – 2002. - №110. – P.521-529.
19. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration // *Science*. – 2003. - №300. – P.1749-1751.
20. Hematti P, Hong BK, Ferguson C, et al. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells // *PLoS Biol*. – 2004. - №2. – P.2183-2190.
21. Schwarzwaelder K, Howe SJ, Schmidt M, et al. Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo // *Clin Invest*. – 2007. - №117. – P.2241-2249.
22. Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, et al. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy // *J Clin Invest*. – 2007. - №117. – P.2225-2232.
23. Aiuti A, Cassani B, Andolfi G, et al. Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy // *J Clin Invest*. – 2007. - №117. – P.2233-2240.
24. Suzuki T, Shen H, Akagi K, et al. New genes involved in cancer identified by retroviral tagging // *Nat Genet*. – 2002. №32. – P.166-174.
25. Calmels B, Ferguson C, Laukkanen MO, et al. Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells // *Blood*. – 2005. - №106. – P.2530-2533.
26. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking // *Science*. – 2002. - №296. – P.497.
27. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. // *Nat Med*. – 2006. - №12. – P.401-409.
28. Du D, Copeland NG. Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary murine bone marrow progenitor cells // *Blood*. – 2005. - №106. – P.3932-3939.
29. Buonamici S, Chakraborty S, Senyuk V, Nucifora G. The role of EVI1 in normal and leukemic cells // *Blood Cells Mol Dis*. – 2003. - №31. – P.206-212.
30. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients // *Blood*. – 2003. - №101. – P.837-845.
31. Kustikova O, Fehse B, Modlich U, et al. Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking // *Science*. – 2005. - №308. – P.1171-1174.
32. Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis // *Blood*. – 2005. - №105. – P.4235-4246.
33. Seggewiss R, Pittaluga S, Adler RL, et al. Acute myeloid leukemia is associated with retroviral gene transfer to hematopoietic progenitor cells in a rhesus macaque // *Blood*. – 2006. - №107. – P.3865-3867.
34. Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration // *Nat Biotechnol*. 2006. - №24. – P.687-696.
35. Modlich U, Bohne J, Schmidt M, et al. Cell culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity // *Blood*. – 2006. - №108. – P.2545-2553.
36. Evans-Galea MV, Wielgosz MM, Hanawa H, Srivastava DK, Nienhuis AW. Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector // *Mol Ther*. – 2007. - №15. – P.801-809.
37. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences // *PLoS Biol*. – 2004. - №2. – P.E234.
38. Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, et al. Foamy virus vector integration sites in normal human cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. - №103. – P.1498-1503.
39. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases // *Nature*. – 2005. - №435. – P.646-651.
40. Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, et al. Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome // *Mol Biol*. – 2006. - №357. – P.28-48.
41. Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC, Bushman FD. HIV integration site selection: Analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications // *Genome Res*. – 2007. - №17. – P.1186-1194.
42. Hacker CV, Vink CA, Wardell TW, et al. The integration profile of EIAV-based vectors // *Mol Ther*. – 2006. - №14. – P.536-545.
43. Themis M, Waddington SN, Schmidt M, et al. Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice // *Mol Ther*. – 2005. - №12. – P.763-771.
44. Yant SR, Wu X, Huang Y, et al. High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals // *Mol Cell Biol*. – 2005. - №25. – P.2085-2094.
45. Nakai H, Wu X, Fuess S, et al. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver // *J Virol*. – 2005. - №79. – P.3606-3614.
46. Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, et al. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors // *Gene Ther*. – 2001. - №8. – P.1343-1346.
47. Bell P, Wang L, Leberherz C, et al. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice // *Mol Ther*. – 2005. - №12. – P.299-306.



Куцев С.И.<sup>1</sup>, Морданов С.В.<sup>1</sup>, Зельцер А.Н.<sup>1</sup>, Оксенюк О.С.<sup>1</sup>, Устаева О.А.<sup>1</sup>,  
Кунгурова Т.И.<sup>1</sup>, Бурнашева Е.В.<sup>2</sup>, Гранкина Е.<sup>2</sup>, Шатохин Ю.В.<sup>2</sup>

## МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА ИНГИБИТОРОМ ТИРОЗИНКИНАЗ ИМАТИНИБОМ

*Ростовский государственный медицинский университет,*

*<sup>1</sup>Лаборатория медицинской генетики,*

*<sup>2</sup>кафедра гематологии и трансфузиологии ФПК и ППС*

*Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский 29, E-mail: kutsev@mail.ru*

Новым стандартом терапии Ph-позитивного хронического миелолейкоза (ХМЛ) является лечение иматинибом – селективным ингибитором Bcr-Abl тирозинкиназы. Лечение иматинибом пациентов в хронической фазе ХМЛ приводит к достижению гематологической и цитогенетической ремиссии с большой частотой. Однако, у некоторых пациентов с ХМЛ наблюдается первичная или приобретенная резистентность к иматинибу. В обзоре обсуждаются различные механизмы развития резистентности к терапии иматинибом и их клиническое значение.

*Ключевые слова:* хронический миелоидный лейкоз, ингибиторы тирозинкиназ, механизмы резистентности

Kutsev S.I.<sup>1</sup>, Mordanov S.V.<sup>1</sup>, Zeltser A.N.<sup>1</sup>, Oxenjuk O.S.<sup>1</sup>, Ustaeva O.A.<sup>1</sup>, Kungurova  
T.I.<sup>1</sup>, Burnasheva E.V.<sup>2</sup>, Grankina E.<sup>2</sup>, Shatokhin Yu.V.<sup>2</sup>

## THE MECHANISMS OF RESISTANCE TO TYROSINE KINASE INHIBITOR IMATINIB THERAPY OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

*Rostov State Medical University*

*<sup>1</sup>Laboratory of Medical Genetics*

*<sup>2</sup>Department of Hematology and Transfusiology*

*29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. Email: kutsev@mail.ru*

Imatinib mesylate is a potent and high selective inhibitor of Bcr-Abl tyrosine kinase, which is established now as the standard of Philadelphia chromosome positive (Ph) chronic myeloid leukemia (CML) treatment. The treatment of patients with chronic phase of CML with imatinib has resulted in high rates of hematologic and cytogenetic responses. Nevertheless, primary and acquired resistance have been observed in few CML patients. The mechanisms of resistance to imatinib and its clinical significance were discussed in this review.

*Keywords:* Chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, mechanisms of resistance

Эффективность терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ) иматинибом – первым препаратом класса ингибиторов тирозинкиназ, доказана в “ключевом” рандомизированном сравнительном исследовании IRIS и других клинических исследованиях. Данные 7-летнего наблюдения за пациентами, получавшими лечение иматинибом в качестве терапии первой линии, показали, что общая выживаемость пациентов с ХМЛ составила 86%, что значительно выше таковой у пациентов, получавших интерферон-альфа или интерферон в сочетании с цитарабином [1]. Также было показано, что у пациентов, достигших цитогенетического и молекулярного ответов на терапию иматинибом в течение первых трех лет лечения, исключительно низкая вероятность рецидива, прогрессии заболевания и появления побочных эффектов.

Тем не менее, к 7 годам наблюдения в исследовании IRIS оказалось очевидным, что из всей группы пациентов, рандомизированных на терапию иматинибом, только 57% сохраняют полный цитогенетический ответ на терапию, проводимую в соответствии с первоначальным протоколом [1]. В недавно опубликованных de Lavallade с соавторами [2] результатах небольшого, одноцентрового исследования также показано, что среди пациентов, получающих иматиниб 5 лет после установления диагноза ХМЛ, полный цитогенетический ответ достигли и удерживают только 63% пациентов.

Таким образом, клиническая резистентность к терапии иматинибом развивается у меньшинства пациентов с ХМЛ, однако в достаточно высоком проценте случаев. Исследователи довольно быстро выявили ряд механиз-



мов, приводящих к “неудаче” терапии иматинибом или к рецидиву ХМЛ.

Наиболее изученными являются так называемые “BCR-ABL связанные” механизмы развития первичной и вторичной резистентности к терапии иматинибом. К ним относятся дупликация или амплификация гена BCR-ABL, выявляемые цитогенетически в виде дупликации Ph-хромосомы или молекулярно-цитогенетически (FISH-анализ) в виде амплификации гена BCR-ABL [3] и мутации гена BCR-ABL [3; 4; 5].

Амплификация гена BCR-ABL как одного из клинически значимых механизмов резистентности к иматинибу у пациентов с ХМЛ является общепризнанной. Однако работы по исследованию амплификации гена BCR-ABL в основном были проведены на клеточных культурах, а описания амплификации гена BCR-ABL *in vivo* у пациентов с ХМЛ единичны. М.Е. Gorre с соавт. [3] методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) показали геномную амплификацию гена BCR-ABL у трех из девя-

ти пациентов с резистентной к иматинибу формой ХМЛ. По данным А. Hochhaus [6], множественные копии гена BCR-ABL методом FISH обнаружены у 2-х из 7-и обследованных пациентов с ХМЛ с первичной резистентностью и не обнаружены ни у одного из 25 пациентов с ХМЛ на фоне рецидива. В нашем недавнем исследовании [7], выполненном на довольно обширной когорте рефрактерных к иматинибу пациентов с ХМЛ (n=100), амплификация гена BCR-ABL выявлена в 18% случаев (рис.1). Оценивая влияние амплификации гена BCR-ABL на достижение цитогенетического ответа при терапии иматинибом, было показано, что у некоторых рефрактерных пациентов с дополнительными копиями гена BCR-ABL сохраняется возможность достижения полного цитогенетического ответа. Однако в нашем исследовании у пациентов с амплификацией гена BCR-ABL вероятность достижения полного цитогенетического ответа после 36 месяцев терапии иматинибом не превышала 20%, тогда как у пациентов без амплификации гена BCR-ABL достигала 70% (рис. 1).

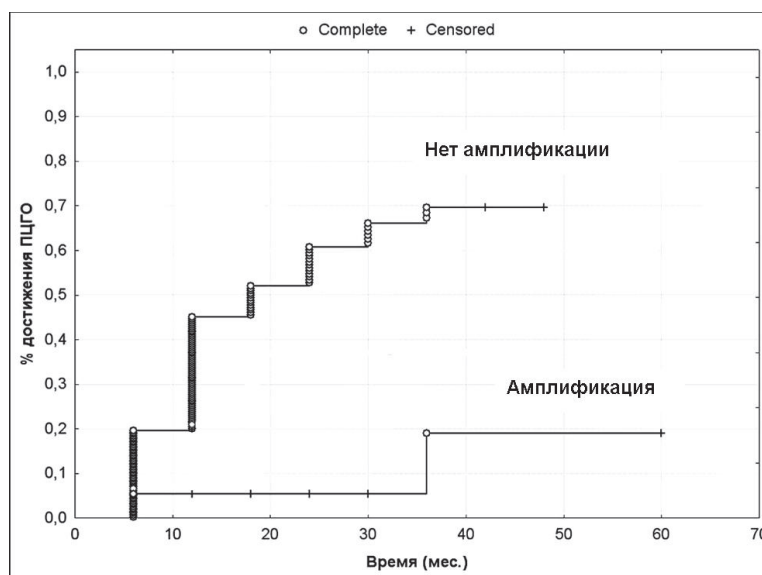


Рис. 1. Вероятность достижения полного цитогенетического ответа (ПЦГО) на терапию иматинибом у больных ХМЛ в зависимости от наличия амплификации гена BCR-ABL (черная линия) ( $p=0,00034$ ).

**Мутации киназного домена гена BCR-ABL.** Хотя к настоящему времени описано много “точечных” мутаций киназного домена гена BCR-ABL и их количество продолжает увеличиваться, клиническое значение каждой из них в индивидуальном прогнозе эффективности терапии иматинибом и другими ингибиторами тирозинкиназ может различаться. Branford S. с соавт. [8] и, особенно, Nicolini с соавт. [9] показали снижение выживаемости без прогрессии и общей выживаемости только у тех пациентов с ХМЛ, которые имели мутацию T315I или различные мутации в участке гена BCR-ABL, кодирующего Р-петлю киназного домена ABL-тирозинкиназы. Использование теста *in vitro* для определения IC50 (50% inhibitor concentration) позволило охарактеризовать чувствительность различных мутантных форм ABL-тирозинкиназы к иматинибу и другим ингибиторам тирозинкиназ. Так, например, такие мутации, как Q252H, V299L, M351T, L384M в тестах *in vitro* приводят лишь к незначительному снижению чувствительности ABL-тирозинкиназы к иматинибу [10] и, вероятно, играют роль в развитии кли-

нической резистентности только в сочетании с другими механизмами. Напротив, мутации G250E, E255K/V, T315I и другие могут приводить к высокому уровню резистентности к иматинибу. Различия в чувствительности ABL-тирозинкиназы к различным ингибиторам тирозинкиназ (иматинибу, дазатинибу, нилотинибу, босутинибу) в зависимости от вида мутации гена BCR-ABL могут использоваться для выбора второй линии терапии у резистентных к иматинибу пациентов [11].

Для проведения мутационного анализа в наше исследование включены 64 пациента с ХМЛ, рефрактерных к терапии иматинибом. В качестве критериев рефрактерности в нашем исследовании рассматривались отсутствие цитогенетического ответа после шести месяцев терапии иматинибом в дозе 400 мг/сутки, частичного цитогенетического ответа – после 12 месяцев терапии, полного цитогенетического ответа – после 18 месяцев терапии. Вторую группу составили пациенты с ХМЛ (n=30), достигшие цитогенетического ответа на терапию иматинибом (400 мг/сутки) в течение 6 – 18 месяцев лечения в соответствии с критериями ELN.



В результате проведенного исследования в группе рефрактерных к иматинибу пациентов (n=64) были обнаружены миссенс-мутации у 16 (25,0%) пациентов (таблица 1).

Среди этих пациентов 1 мутация выявлена у 10 (62,5%) пациентов и компаунд мутации (2 или 3) выявлены у 6 (37,5%) больных ХМЛ. Всего выявлено 23 мутации.

Таблица 1.

Мутации гена *BCR-ABL*, выявленные у рефрактерных к иматинибу пациентов с ХМЛ

№	Пациент	Мутация	Соотношение клонов %N/%M
1	А.С.	L248V	80 /20
2	К.М.	L248V	0 /100
3	И.А.	M244V + M351T	0/100/10
4	К.М.	L248V + F359C	0-20/70/80
5	И.З.	T315I	0/100
6	Б.А.	Q252E	40/60
7	Ш.В.	M244I	80/20
8	М.Л.	F311L	0/100
9	О.Т.	M244I	50/50
10	В.Н.	M244I + G255E	0-80/20/20
11	С.Х.	H396R	0/100
12	Х.С.	L248V + T315S + Q346H	0/100/50/50
13	Д.Е.	F401L	75/25
14	К.М.	L248V + Y253H	0-20/80/15
15	О.Т.	M 244I	70/30
16	С.А.	Y253H + Y435C	0-50/50/50

Анализ локализации выявленных мутаций показал, что 15 (65,3%) из 23 выявленных мутаций локализованы в участке гена *BCR-ABL*, кодирующем Р-петлю (рис. 2). Мутации Р-петли критичны, поскольку именно в ней расположен АТФ-связывающий карман, являющийся мишенью для иматиниба. Основным последствием мута-

ций, затрагивающих Р-петлю, являются нарушение связывания иматиниба с белком *BCR-ABL* тирозинкиназой. Выявленные мутации Р-петли по литературным данным приводят к значительному снижению чувствительности *BCR-ABL* позитивных клеток к иматинибу в тестах *in vitro*.

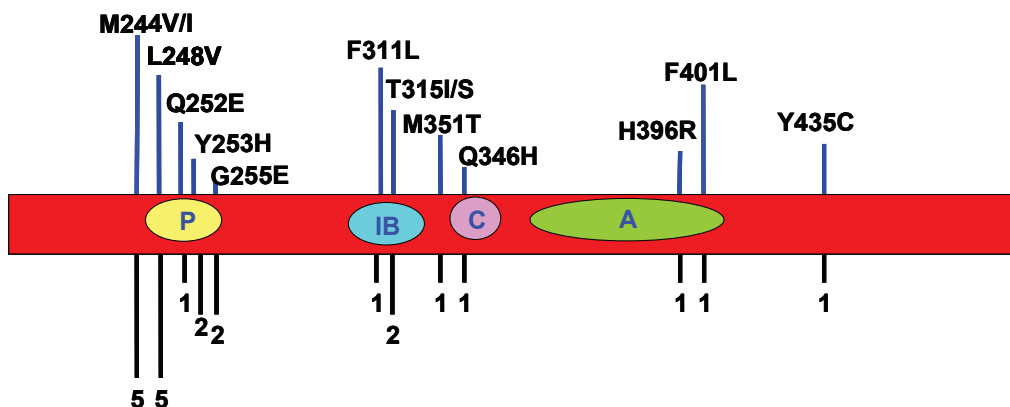


Рис. 2. Схематическое изображение локализации и количества выявленных мутаций в областях гена *BCR-ABL*, кодирующих Р-петлю (P), IB-домен (IB), каталитический домен (C) и активационную петлю (A) киназного домена *BCR-ABL* тирозинкиназы

Проведенное исследование влияние мутаций гена *BCR-ABL* на вероятность достижения большого и полного цитогенетического ответа (БЦГО и ПЦГО), большого молекулярного ответа (БМО) показало, что достижение цитогенетического и молекулярного ответов зависит

от наличия мутаций в гене *BCR-ABL*: вероятность достижения БЦГО, ПЦГО и БМО статистически достоверно ниже у пациентов с мутациями гена *BCR-ABL* (БЦГО – p=0,00028, ПЦГО – p=0,00699 и БМО – p=0,04572) (рис. 3).

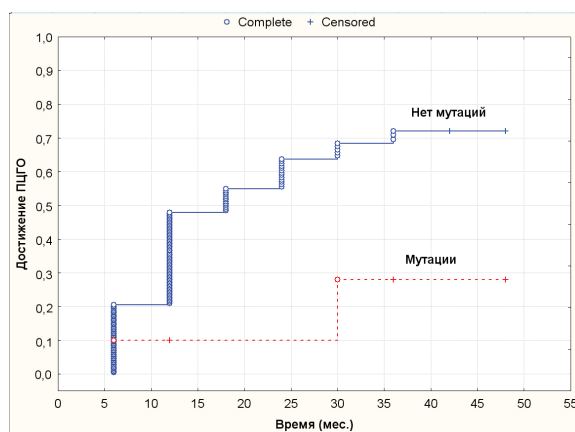


Рис. 3. Вероятность достижения полного цитогенетического ответа (ПЦГО) у больных ХМЛ в зависимости от появления мутаций в гене *BCR-ABL* ( $p=0,00699$ ).

Не связанные с *BCR-ABL* тирозинкиназой механизмы включают появление дополнительных хромосомных aberrаций, которые выявляются с помощью цитогенетического мониторинга, а также группу механизмов формирования резистентности, для которой характерны изменения фармакокинетики ингибиторов тирозинкиназ: низкий уровень иматиниба в плазме крови, обусловленный различными причинами (избыточное связывание иматиниба с сывороточным альфа-1-кислым гликопротеином, избыточная метаболизация лекарственного препарата ферментами цитохрома P450, снижение комплаентности пациентов с ХМЛ к терапии иматинибом), а также низкая внутриклеточная концентрация иматиниба, обусловленная низким уровнем экспрессии белка-транспортера OAT1, обеспечивающего транспорт иматиниба из межклеточного пространства в клетку.

**Клональная цитогенетическая эволюция.** Одним из основных “*BCR-ABL* несвязанных” механизмов резистентности и, одновременно, прогрессии ХМЛ является “клональная эволюция” – появление дополнительных хромосомных aberrаций в Rh-позитивных лейкозных клетках. Клональная эволюция в полном объеме может быть выявлена только при исследовании костного мозга

стандартным цитогенетическим исследованием, позволяющим оценить весь хромосомный набор опухолевой клетки.

По мнению Marktel S. с соавт. [12], O’Dwyer M.E. с соавт. [13], Домрачевой Е.В. с соавт. [14], Мартынкевич И.С. с соавт. [15] пациенты в хронической фазе ХМЛ, имеющие дополнительные хромосомные aberrации в Rh-позитивных клетках, характеризуются худшим прогнозом по сравнению с пациентами, не имеющими признаков клональной эволюции. Cortes J.E. с соавт. [16] подчеркнули, что признак клональной эволюции является независимым неблагоприятным прогностическим фактором выживаемости пациентов с ХМЛ как в хронической фазе, так и в фазе акселерации. В одном из наших исследований также было показано, что появление дополнительных хромосомных aberrаций обладает неблагоприятным прогностическим влиянием на исход терапии ХМЛ иматинибом, поскольку появление этих аномалий статистически достоверно ассоциировано со снижением вероятности достижения большого и полного цитогенетических ответов почти в 3 раза (рис. 4) и уменьшением 5-летней общей выживаемости по Каплан-Майеру до 74% по сравнению с 97% [17].

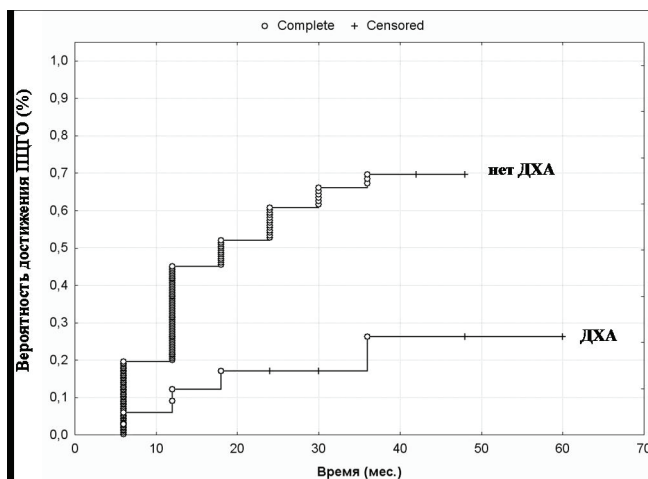


Рис. 4. Вероятность достижения большого цитогенетического ответа (БЦГО) у больных хроническим миелолейкозом с дополнительными хромосомными аномалиями (ДХА) в Rh-позитивных клетках ( $p=0,00001$ ).



**Снижение концентрации иматиниба в плазме.** По данным различных авторов концентрация иматиниба в плазме крови является достаточным вариабельным показателем [18; 19], имеющим мультифакториальную основу. Вне зависимости от механизмов изменения концентрации иматиниба в плазме крови, в настоящее время имеются сведения о том, что низкая концентрация иматиниба в плазме крови может являться причиной субоптимального ответа или отсутствия ответа на терапию иматинибом, а минимально необходимой для достижения ответа на терапию иматинибом признана концентрация не менее 1000 нг/мл [19; 20; 21].

Причиной снижения концентрации иматиниба в плазме может быть генетический полиморфизм ферментов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов. Эксперименты *in vitro* показали, что наибольшее значение для метаболизма иматиниба имеет активность ферментной системы цитохрома P450, а именно – изоферментов CYP3A4 и CYP3A5 [18], [23]. Между тем, существует значительная вариабельность активности этих ферментов у разных людей [22], обуславливающая наблюдаемые различия в концентрации иматиниба.

Одной из объективных причин снижения концентрации иматиниба в плазме крови являются межлекарственные взаимодействия. Прием препаратов, относящихся к индукторам ферментов CYP3A4/5 цитохрома P450, одновременно с иматинибом очевидно вызовет снижение концентрации последнего, поскольку высокая активность этих ферментов приведет к быстрой метаболизации иматиниба [23]. Конечно, речь может идти только о терапии хронических сопутствующих заболеваний в течение длительного периода времени, например – терапия туберкулеза рифампицином [24].

В нашем исследовании влияния концентрации иматиниба в плазме на достижение БМО были включены 49 пациентов [25]. Все пациенты находились в хронической фазе заболевания и получали терапию иматинибом в дозе 400 мг/сутки в течение 18–36 месяцев.

Среди 49 пациентов, получавших терапию иматинибом ( $C_{\min}$ ) в дозе 400 мг/сутки в течение 18–36 месяцев и включенных в наше исследование, 18 больных ХМЛ (36,7%) достигли большого молекулярного ответа ( $\Delta \lg BCR-ABL > 3$ ) и 31 пациент с ХМЛ (63,3%) не достиг большого молекулярного ответа ( $\Delta \lg BCR-ABL < 3$ ).

В группе пациентов с ХМЛ ( $n=18$ ), достигших большого молекулярного ответа, средний возраст составил 54 года, соотношение мужчин и женщин 8/10, средняя длительность терапии иматинибом – 29 месяцев. Среднее значение  $C_{\min}$  иматиниба в плазме крови в этой группе пациентов составило  $1729,2 \pm 215,0$  нг/мл, медиана – 1558,5 нг/мл, минимальное значение – 447,0 нг/мл, максимальное значение – 3394,0 нг/мл. В группе пациентов с ХМЛ ( $n=31$ ), не достигших большого молекулярного ответа, средний возраст составил 51 год, соотношение мужчин и женщин – 16/15, средняя длительность терапии иматинибом – 24 месяца. Среднее значение  $C_{\min}$  в плазме крови в этой группе пациентов составило  $962,1 \pm 77,2$  нг/мл, медиана – 922,0 нг/мл, минимальное значение – 263,0 нг/мл, максимальное значение – 2472,0 нг/мл. Проведенный статистический анализ с использованием критерия Манна-Уитни (U – тест) показал, что между группами пациентов с ХМЛ, достигших большого молекулярного ответа и не достигших его, средние значения  $C_{\min}$  иматиниба в плазме различаются статистически достоверно ( $p=0,0007$ ). Распределение этих же групп пациентов по квартилям в зависимости от  $C_{\text{trough}}$  иматиниба показало, что 75% больных ХМЛ с молекулярной ремиссией имели концентрацию иматиниба выше 992 нг/мл (рис. 5).

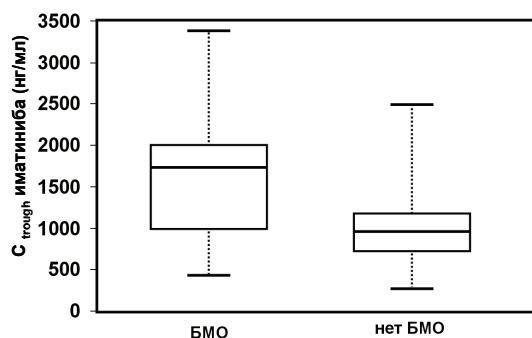


Рис. 5. Дисперсия медианы значения  $C_{\text{trough}}$  иматиниба у больных ХМЛ с большим молекулярным ответом (БМО) и без большого молекулярного ответа (нет БМО).

#### **Приверженность (комплаентность) больных ХМЛ к терапии иматинибом.**

История масштабного клинического применения иматиниба у больных ХМЛ насчитывает уже 10 лет. Однако проблема комплаентности пациентов к проводимому лечению особенно остро осознана гематологами только в последние годы. Действительно, оценка эффективности препарата, особенно в рутинной практике, а не в рамках контролируемого клинического исследования, невозможна без учета приверженности пациентов к назначенному лечению. Впервые субоптимальная комплаентность па-

циентов с ХМЛ и гастроинтестинальными стромальными опухолями к терапии иматинибом была выявлена в работе J. Tsang с соавт. [26]. В ней проанализировали динамику изменения комплаентности к иматинибу у 4043 пациентов с ХМЛ и гастроинтестинальными стромальными опухолями в течение 24 месяцев терапии иматинибом. Общая комплаентность, определяемая как отношение принятой дозы к дозе, назначенной врачом, составила 75%. Только 50% пациентов имели 100% комплаентность.

В работе StCharles M.St. [27] приверженность пациентов с ХМЛ к терапии иматинибом оценивалась в группе



из 340 пациентов как процентное отношение количества дней, в которые пациент принимал препарат, к количеству дней наблюдения. Авторы также выявили субоптимальную комплаентность, поскольку только 64% пациентов были признанными приверженными к терапии иматинибом.

Снижение приверженности больных к терапии приводит к снижению концентрации препарата по сравнению с терапевтически необходимой и, как следствие, снижению эффективности терапии. В нашем исследовании было выявлено, что перерывы терапии иматинибом более 30 дней в течение первого года лечения приводят к снижению в 2 раза вероятности достижения полного цитогенетического ответа после 12 месяцев терапии [28].

В последние годы активно обсуждается использование лекарственного терапевтического мониторинга для оценки комплаентности пациентов к терапии иматинибом. Однако каких-либо публикаций, кроме описания отдельных случаев, посвященных использованию этого теста в целях оценки комплаентности, нами не обнаружено [29]. При всей очевидности пользы такого исследования, оценка приверженности к терапии иматинибом таким способом имеет ряд ограничений. Во-первых, в случае выявления крайне низкой концентрации иматиниба в плазме можно говорить об отсутствии приема препарата в течение одних или нескольких суток и не более. Во-вторых, забор крови для исследования концентрации иматиниба должен быть «сюрпризом» для пациента, что не вполне корректно с этической точки зрения. Однако это этическое ограничение легко преодолевается, если пациенту при визите к врачу предлагается подписать информированное согласие. Пациент в этом случае сам волен решать – дать ему согласие на оценку его комплаентности или отказаться от подобного исследования.

Целью нашего исследования явилось изучение возможностей терапевтического лекарственного мониторинга для оценки приверженности пациентов с ХМЛ к терапии иматинибом [30]. В исследование включены 442 больных ХМЛ, получающих терапию иматинибом в дозе 300 мг/сутки (n=8), 400 мг/сутки (n=337), 600 мг/сутки (n=337), 800 мг/сутки (n=51). В хронической фазе находилось 395 пациентов, в фазе акселерации – 48. Средний возраст составил 48 лет (18-80), соотношение мужчин и женщин – 201/241, средняя длительность терапии иматинибом – 27 месяцев (6-84). Исследование концентрации иматиниба в плазме проводили пациентам с ХМЛ по следующим показаниям: отсутствие ответа, субоптимальный ответ, потеря ответа на терапию иматинибом; подозрение на взаимодействие иматиниба с другими лекарственными средствами; непереносимость терапии иматинибом; подозрение на несоблюдение пациентом режима приема препарата. С целью определения остаточной концентрации  $C_{\text{trough}}$  иматиниба забор крови проводили через 24±3 часа после последнего приема иматиниба у пациентов, получавших препарат однократно в дозе 300, 400 или 600 мг/сутки, или через 12±3 часа после последнего приема препарата у пациентов, получавших иматиниб 2 раза по 400 мг/сутки (800 мг/сутки). Перед забором образцов крови все пациенты дали письменное информированное согласие на проведение исследования. Определение концентрации иматиниба проводили валидированным методом ВЭЖХ/МС/МС. Всего для 442 больных было выполнено 551 исследование. В качестве критерия комплаентности пациентов выбраны наименьшие значения concentra-

ции иматиниба, которые были выявлены в I, II и III фазах клинических исследований иматиниба. Для суточных доз 400, 600 и 800 мг иматиниба наименьшая его концентрация была 180, 350 и 1020 нг/мл соответственно.

В результате проведенного исследования в группе пациентов с ХМЛ не достигших ответа, с субоптимальным ответом или потерявших ответ на терапию иматинибом (n=406) в дозе 400 мг/сутки (n=242) медиана  $C_{\text{trough}}$  иматиниба составила 963 [0-5140] нг/мл (у 8 (3,3%) пациентов концентрация была менее 180 нг/мл), 600 мг/сутки (n=124) – 1369 [2,5–3813] нг/мл (у 7 (5,6%) пациентов концентрация была менее 350 нг/мл), 800 мг/сутки – 1845 [5–5089] нг/мл (у 9 (22,5%) пациентов концентрация была менее 1020 нг/мл).

В группе пациентов с подозрением на нарушение режима приема препарата (n=66) медиана  $C_{\text{trough}}$  иматиниба составила у больных, получающих 400 мг/сутки (n=46) – 861 [0–3394] нг/мл (у 4 (8,5%) пациентов концентрация была менее 180 нг/мл), 600 мг/сутки (n=14) – 1287 [400–3813] (пациенты с концентрацией менее 350 нг/мл не обнаружены), 800 мг/сутки (n=6) – 1287 [215–3813] нг/мл (у 2 (33%) пациентов концентрация была менее 1020 нг/мл).

В группе больных с подозрением на межлекарственные взаимодействия (n=13) медиана  $C_{\text{trough}}$  иматиниба составила у больных, получающих 400 мг/сутки (n=10) – 861 [0–3394] нг/мл и у 2 пациентов концентрация была менее 180 нг/мл. У двух пациентов, получавших терапию иматинибом в дозе 600 мг/сутки, и 1 пациента – 800 мг/сутки концентрация  $C_{\text{trough}}$  иматиниба была достаточно высокой – 2940, 3635 и 1580 нг/мл.

В группе больных с выраженными побочными эффектами терапии иматинибом медиана его остаточной концентрации  $C_{\text{trough}}$  у пациентов, получавших иматиниб в дозе 300 мг/сутки (n=8) – 699 [274–1550] нг/мл, 400 мг/сутки (n=39) – 967 [269–3827], 600 мг/сутки (n=15) – 1223 [544–3460] нг/мл, 800 мг/сутки (n=4) – 921 [381–2470] нг/мл. Только у 2 пациентов, получавших иматиниб в дозе 800 мг/сутки, обнаружены значения  $C_{\text{trough}}$  иматиниба ниже референтных.

Таким образом в нашем исследовании у 32 (5,8%) пациентов с ХМЛ обнаружены значения  $C_{\text{trough}}$  иматиниба ниже минимальных референтных значений, что свидетельствует о нарушении режима приема препарата. Также отмечено, что с повышением дозы препарата количество некомплаентных пациентов увеличивается с 4,2% у больных, получающих иматиниб в дозе 400 мг/сутки, до 25,5% у больных, получающих иматиниб в дозе 800 мг/сутки.

**Сниженная экспрессия белка hOCT1.** В последние годы активно обсуждается роль транспортных белков клеточной мембраны, обеспечивающих поступление лекарственных препаратов из межклеточного пространства в цитоплазму клеток, в развитии фармакокинетической резистентности к терапии иматинибом, например – органического катионного транспортного белка hOCT1, транспортирующего иматиниб внутрь клетки. Thomas J. с соавт. [31] в культуре клеток показали, что уровень экспрессии белка hOCT1 коррелирует с уровнем опосредованного этим белком поступления иматиниба внутрь клетки. White D.L. с соавт. [32] обнаружили различную чувствительность к иматинибу культивируемых клеток крови, полученных от 25 нелеченых пациентов с ХМЛ, в зависимости от уровня экспрессии белка hOCT1. Ограниченность клинического значения этих данных обусловлена слишком маленькой выборкой пациентов и отсутствием каких-либо корреляций с клиническими данными.





Более интересны наблюдения Crossmann с соавт. [33], выявивших, что высокий уровень экспрессии белка hOCT1 в клетках костного мозга коррелирует с достижением полного цитогенетического ответа у пациентов, получавших терапию иматинибом более 10 месяцев. Напротив, пациенты с низким уровнем экспрессии этого транспортного белка достигали менее чем минимального цитогенетического ответа. Тем не менее, в этой работе также была обследована небольшая группа пациентов и не анализировались возможные другие механизмы резистентности к иматинибу.

В недавно опубликованном исследовании Wang L. с соавт. [34] в более представительной группе пациентов с ХМЛ (n=70) показали статистически достоверные различия в достижении полного цитогенетического ответа после 6 месяцев терапии, а также в выживаемости без прогрессии и общей выживаемости у пациентов с ХМЛ в зависимости от уровня экспрессии hOCT1.

Таким образом, анализ механизмов резистентности показал, что несомненное клиническое значение имеют исследования BCR-ABL зависимых механизмов резистентности к терапии иматинибом – амплификация гена *BCR-ABL*, выявляемая FISH анализом или цитогенетическим методом в виде дупликации Ph-хромосомы, и мутации гена *BCR-ABL*. Из BCR-ABL независимых механизмов наибольшее значение для практики имеет выявление цитогенетической клональной эволюции – появление дополнительных хромосомных aberrаций в Ph-позитивных клетках. Лекарственный мониторинг терапии ХМЛ не обозначен как необходимый в рекомендациях по лечению ХМЛ, разработанных European LeukemiaNet (ELN) [35]. Однако к настоящему времени накоплены многочисленные данные об использовании теста измерения концентрации иматиниба для оценки резистентности в рутинной практике терапии ХМЛ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. O'Brien S.G., Guilhot F., Goldman J.M. et al. International randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) 7-year follow-up: sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CMLCP) treated with imatinib (IM) // *Blood*. – 2008. – V. 112, № 11. – P.186.
2. de Lavallade H., Apperley J.F., Khorashad J.S. et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – V.26, № 20. – P.3358-3363.
3. Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification // *Science*. – 2001. – V.293, №5531. – P.876-880.
4. Roche-Lestienne C., Soenen-Cornu V., Gardel-Duflos N. et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment // *Blood*. – 2002. – V.100, № 3. – P.1014-1018.
5. Shah N.P., Nicoll J.M., Nagar B. et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia // *Cancer Cell*. – 2002. – V.2, № 2. – P.117-125.
6. Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib // *Semin. Hematol.* – 2003. – V.40, № 2, Suppl 2. – P.69-79.
7. Куцев С.И., Морданов С.В. Амплификация гена BCR-ABL у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, рефрактерных к иматинибу // *Онкогематология*. – 2009, №3. – С. 57-61.
8. Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis // *Blood*. – 2003. – V.102, №1. – P.276-283.
9. Nicolini F.E., Corm S., Le Q.H. et al. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP) // *Leukemia*. – 2006. – V.20, №6. – P.1061-1066.
10. Redaelli S., Piazza R., Rostagno R. et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – V.20, № 27(3). – P.469-471.
11. Куцев С.И., Вельченко М.В. Значение анализа мутаций гена BCR-ABL в оптимизации таргетной терапии хронического миелолейкоза // *Клиническая онкогематология*. – 2008. – Т. 1, №3. – С. 190-199.
12. Marktel S., Marin D., Foot N. et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression // *Haematologica*. – 2003. – Vol.88, №3. – P.260-267.
13. O'Dwyer M.E., Mauro M.J., Blasdel C. et al. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate // *Blood*. – 2004. – Vol.103, №2. – P.451-455.
14. Домрачева Е.В., Захарова А.Е., Асеева Е.А. Прогностическое значение дополнительных цитогенетических аномалий при хроническом миелолейкозе // *Гематол. и трансфузиол.* – 2005. – Т. 50, №4. – С. 37-41
15. Мартынкевич И.С., Мартыненко Л.С., Иванова М.П. и др. Дополнительные хромосомные aberrации у больных хроническим миелолейкозом // *Гематол. и трансфузиол.* – 2007. – Т. №2. – С. 28-35.
16. Cortes J.E., Talpaz M., Giles F. et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy // *Blood*. – 2003. – Vol.101, №10. – P. 3794-3800.
17. Куцев С.И., Морданов С.В., Зельцер А.Н. Прогностическое значение дополнительных хромосомных аномалий в Ph-позитивных клетках в терапии иматинибом хронического миелолейкоза // *Медицинская генетика*. – 2009. – № 10. – С. 27-33.
18. Peng B., Hayes M., Resta D. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – V.22, № 5. – P. 935-942.
19. Larson R.A., Druker B.J., Guilhot F. et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study // *Blood*. – 2008. – V.111, №8. – P. 4022-4028.
20. Picard S., Titier K., Etienne G. et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia // *Blood*. – 2007. – V.109, № 8. – P. 3496-3499.
21. Singh N., Kumar L., R. Meena, T. Velpandian. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: comparing plasma levels of responders and non-responders // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2009. – V.65, № 6. – P.545-549
22. Wilkinson G.R. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans // *J. Pharmacokinet. Biopharm.* – 1996. – V. 24, № 5. – P.475-490.
23. Peng B., Lloyd P., Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib // *Clin Pharmacokinet.* – 2005. – V.44, № 9. – P. 879-894.
24. Bolton A.E., Peng B., Hubert M. et al. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of imatinib mesylate (Gleevec, STI571) in



- healthy subjects // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2004. – V.53, № 2. – P.102-106
25. Куцев С.И., Оксенюк О.С. Лекарственный мониторинг в терапии хронического миелолейкоза иматинибом // *Клиническая онкогематология.* – 2009. – Т. 2, № 3. – С. 256-261.
26. Tsang J., Rudychev L., Pescatore S.L. Prescription compliance and persistency in chronic myelogenous leukemia (CML) and gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients (pts) on imatinib (IM) // *J.Clin. Oncol.* – 2006. – V. 24, №18S – P. 6119.
27. StCharles M.St., Bollu V., Hornyak E. et al. Predictors of treatment non-adherence in patients treated with Imatinib mesylate for chronic myeloid leukemia // *Blood.* – V.114, №22. – P. 870.
28. Куцев С.И., Шатохин Ю.В. Влияние перерывов терапии иматинибом на достижение цитогенетического и молекулярного ответов у больных хроническим миелолейкозом // *Казан. мед. журн.* – 2009. – Т. 90, №6. – С. 827-831.
29. Mahon F.-X., Picard S., Marit G., Robinson P., Molimard M. Use of therapeutic drug monitoring in CML patients on imatinib // *Blood.* – 2007. – V.110, № 5. – P. 1701.
30. Куцев С.И., Оксенюк О.С., Кравченко Е.Г. и др. Лекарственный мониторинг терапии хронического миелолейкоза иматинибом // *Клиническая онкогематология.* – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 1-9.
31. Thomas J., Wang L., Clark R.E., Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance // *Blood.* – 2004. – V.104, №12. – P. 3739-3745.
32. White D.L., Saunders V.A., Dang P. et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to Imatinib // *Blood.* – 2006. – V.108, №2. – P.697-704.
33. Crossman L.C., Druker B.J., Deininger M.W. et al. hOCT 1 and resistance to imatinib // *Blood.* – 2005. – V.106, №3. – P. 1133-1134.
34. Wang L., Giannoudis A., Lane S. et al. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2008. – V.83, №2. – P.258-264.
35. Baccarani M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – V.27, №35. – P. 6041-6051.

ПОСТУПИЛА: 11.10.2010



Румянцев С.А.<sup>1</sup>, Майорова О.А.<sup>1</sup>, Зимина Н.Н.<sup>2</sup>, Яковлева М.В.<sup>3</sup>, Курцер М.А.<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ АНТЕ- И ИНТРАНАТАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПУПОВИННОЙ КРОВИ ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии  
Минздрава России

Россия, 117997, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117/2. E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru

<sup>2</sup>Центр Планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения г. Москвы  
Россия, 117209, г. Москва, Севастопольский проспект, 24 «А»

<sup>3</sup>Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы  
Россия, 115516, Москва, Бакинская ул., 31

Гипоксия является мощным стрессовым фактором, и, предположительно, должна приводить не только к повышению количества эритроцитов с компенсаторной целью, но и к повышению количества других клеток крови как следствие цитокиновой мобилизации в ответ на стресс.

В статье приведена оценка влияния течения беременности и родов, острой и хронической гипоксии плода на показатели клеточного состава ПК доношенных новорожденных, продемонстрировавшая увеличение количества лейкоцитов при удлинении второго периода родов, наличии хронической внутриутробной гипоксии плода или острой гипоксии в родах. Показаны различия клеточного состава ПК в зависимости от пола и массы тела плода, которые заключаются в большем количестве лейкоцитов за счет всех субпопуляций, в том числе гемопоэтических стволовых клеток у мальчиков и при большой массе плода, причем различия по полу и массе плода независимы друг от друга. Показано, что мальчики хуже адаптируются к процессу родов, что выражается в большей концентрации мобилизационных цитокинов и большем количестве лейкоцитов и гемопоэтических клеток-предшественников в пуповинной крови. Показано, что концентрация мобилизационных цитокинов (IL-8, G-CSF, MMP-9) в сыворотке ПК доношенных новорожденных статистически значимо выше, чем в сыворотке крови здоровых доноров. При этом концентрация IL-8, G-CSF, MMP-9 выше у мальчиков по сравнению с девочками, при самопроизвольных родах, по сравнению с родами путем планового кесарева сечения и при острой гипоксии плода.

*Ключевые слова:* пуповинная кровь, лейкоциты, CD34+клетки, КОЕ, гипоксия плода, апоптоз.

Roumiantsev S.A.<sup>1</sup>, Mayorova O.A.<sup>1</sup>, Zimina N.N.<sup>2</sup>, Yakovleva M.V.<sup>3</sup>, Kurtser M.A.<sup>2</sup>

## INFLUENCE OF AN ANTE- AND INTRANATAL FACTORS ON CORD BLOOD CELL COMPOSITION OF FULLTERM NEWBORNS

<sup>1</sup>Federal Research Center of pediatric hematology, oncology and immunology  
117/2 Leninskiy pr., Moscow. 117997, Russia. E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru

<sup>2</sup>Moscow Center of family planning and reproduction  
24 «А» Sevastopolsky avenue, Moscow, 117209, Russia

<sup>3</sup>Moscow stem cell bank  
31 Bakinskaya st., Moscow, 115516, Russia

The hypoxia is the powerful stressful factor, and, presumably, should result not only in rising of erythrocytes counts for the compensatory purpose, but also in rising of other blood cells number, as consequence of mobilization in the answer stress.

In article the influence assessment of pregnancy and delivery features, acute and chronic fetal hypoxia on cord blood cell composition of the full-term newborns is shown. Increase of leucocytes count at elongation of the second period of delivery, presence of chronic prenatal hypoxia or acute hypoxia in delivery is revealed. Differences of cord blood cell composition depending on newborn gender and body weight which consist in higher leucocytes count (all subpopulations including hematopoietic stem cells) at boys and at higher body weight are shown. Differences according to gender and to body weight are independent from each other. It is shown, that boys worse adapt for delivery that is expressed in higher concentration of mobilization cytokines and higher leucocytes and hemopoietic progenitors count in cord blood. It is shown, that mobilization cytokine concentration (IL-8, G-CSF, MMP-9) in cord blood of full-term newborns statistically significantly above, than in peripheral blood of healthy donors. Thus IL-8, G-CSF, MMP-9 concentration higher at boys in comparison with girls; at normal delivery in comparison with delivery by planned cesarean sections and at acute fetal hypoxia.

*Keywords:* Cord blood, leucocytes, CD34+cells, CFU, fetal hypoxia, apoptosis.



### Введение

Гипоксия является мощным стрессовым фактором, и, предположительно, должна приводить не только к повышению количества эритроцитов с компенсаторной целью, но и к повышению количества других клеток крови, как следствие цитокиновой мобилизации в ответ на стресс.

В ряде работ было показано, что выраженная гипоксия (концентрация  $O_2$  – 0,9%-1%) *in vitro* способствует самообновлению мышечных и человеческих ГСК [1-2], при этом она не ведет к их дифференцировке. Ответом на сильную гипоксию CD34+ клеток пуповинной крови (концентрация  $O_2$  – 3%) *in vitro*, было деление [3]. Количество CD34+ клеток инкубированных в условиях гипоксии (концентрация  $O_2$  – 1%) было значимо больше, чем в культурах, инкубированных без гипоксии [4]. Таким образом, баланс между дифференцировкой и самообновлением стволовых клеток сдвинут в сторону последнего. Показано, что концентрация кислорода регулирует дифференцированную экспрессию белков cd34FL и cd34TFmRNA, что может объяснить лучшую выживаемость примитивных гемопоэтических клеток при низкой концентрации кислорода [5].

При культивировании CD34+клеток хронического миелолейкоза в условиях гипоксии (концентрация  $O_2$  – 0,9-1%) и нормоксии (концентрация  $O_2$  – 20%), было выявлено, что гипоксия уменьшает фосфорилирование тирозинкиназ [6], что может способствовать снижению влияния ростовых факторов непосредственно на ГСК.

Многие исследователи демонстрируют, что гипоксия индуцирует клеточную смерть, активируя как апоптотический, так и некротический пути [7-8], в зависимости от типа клеток [9]. При исследовании влияния 24-х часовой аноксии на апоптоз CD34+клеток пуповинной крови, было показано, что клетки, инкубированные в условиях аноксии, менее подвержены апоптозу и некрозу, при сравнении с теми же клетками, инкубированными в условиях нормоксии [10]. Объяснением этого может быть экспрессия на CD34+клетках пуповинной крови антиапоптотических Bcl-2 и Bcl-XL [11], гиперэкспрессия которых

блокирует индуцированный гипоксией апоптоз [9]. Это показывает, что CD34+клетки пуповинной крови относительно устойчивы к действию гипоксии.

Появившиеся в последнее время сообщения о различии клеточного состава пуповинной крови в зависимости от вида родоразрешения, от пола и массы тела новорожденного, а также от сроков, прошедших после родов и сбора пуповинной крови до начала процесса обработки [12-15], демонстрируют, что остаются неясными множество факторов, влияющих на клеточный состав пуповинной крови и, как следствие, на эффективность заготовки трансплантационного материала. Таким образом, целью настоящего исследования служило изучение влияния различных состояний острой и хронической гипоксии плода на количество и жизнеспособность лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови доношенных новорожденных.

### Материалы и методы

Пуповинную кровь получали при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37–41 недель гестации (медиана – 40 недель)) с учетом информированного согласия матери и отсутствия стандартных противопоказаний. После пережатия и пересечения пуповины, проводили пункцию сосудов пуповины специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA (GreenCross, Юж.Корея). Сбор крови осуществляли в течение 2–15 минут после родов (менее 5 минут – 847 случаев (84,4%), от 5 до 10 минут – 89 случаев (8,7%) и более 10 минут – 68 (6,9%)), до отделения плаценты (n=993 (98,5%)). В случае сбора крови после отделения плаценты (n=15 (1,5%)), плацента помещалась в специальную стерильную стойку и проводилась аналогичная процедура сбора ПК. Полученный материал хранили в темном месте при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 18 часов после процедуры сбора ПК.

Течение беременности проанализировано у 1004 рожениц и представлено в табл. 1.

Таблица 1.

Особенности течения беременности (количество наблюдений)

№№	Состояние	Кол-во	1 половина беременности	2 половина беременности	1 и 2 половина беременности
1	Полностью здоровы	449			
2	Анемия	41	10	28	3
3	Инфекционные заболевания	205	72	121	12
4	Угроза прерывания беременности	260	176	41	43
5	Патология почек у матери	47	47		
6	Хроническая внутриутробная гипоксия	112	112		
7	Ожирение у матери	19	19		
Общее количество наблюдений		1133*			

\*- Общее количество наблюдений больше числа рожениц за счет наличия нескольких ситуаций одновременно.

Из 1004 новорожденных 585 родились в результате первых родов, 340 – вторых, 63 – третьих и 16 – роды чет-

вертые и более (12 человек – 4-е роды, 2 человека – 5-е и 2 человека – 6-е). Процент мальчиков и девочек среди



групп, составленных по паритету, не отличался. В каждой из групп девочек и мальчиков было приблизительно поровну. Медиана длительности безводного промежутка составила 5 часов (от 20 минут до 19 часов 20 минут). Медиана длительности II периода родов (от начала потуг до рождения ребенка) составила 30 минут (от 10 минут до 1 часа 35 минут).

Из 1004 новорожденных, мальчиков и девочек было 524 (52,2%) и 480 (47,8%), соответственно. Все новорожденные были разделены на группы согласно способу родоразрешения: самопроизвольные роды и роды путем кесарева сечения (табл. 2).

Таблица 2

**Распределение мальчиков и девочек по полу и способу родоразрешения**

Кол-во пациентов	Мальчики	Девочки	Всего
Кесарево сечение	26	17	43
Самопроизвольные роды	498	463	961
Всего	524	480	1004

Средняя масса при рождении была несколько выше у мальчиков (3629,24±18,25 г.; диапазон: 2270-5000 г.), чем у девочек (3467,23±18,17 г.; диапазон: 2300-4650 г.) ( $p < 0,0001$ ). Течение родов прослежено у 1004 новорожденных. Из 1004 новорожденных у 112 отмечалась хроническая внутриутробная гипоксия плода, а у 90 – острая гипоксия плода.

Подсчет клеток крови проводился двумя методами:

- все 1004 образца ПК были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови АВХPentra 60 С+ в режиме автоматической аспирации с определением 26 параметров;
- для точной морфологической характеристики клеток ПК использовали мазки ПК, окрашенные по методу Паппенгейма-Крюкова (комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая-Грюнвальда и краской Романовского);

Количество нормобластов определяли при подсчете лейкоцитарной формулы на 200 последовательно встречающихся лейкоцитов с дальнейшим пересчетом на 100 (нормобласты/100 лейкоцитов).

Подсчет клеток крови проводился двумя методами:

- все 1004 образца ПК были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови АВХPentra 60 С+ в режиме автоматической аспирации с определением 26 параметров;
- для точной морфологической характеристики клеток ПК использовали мазки ПК, окрашенные по методу Паппенгейма-Крюкова (комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая-Грюнвальда и краской Романовского);

Количество нормобластов определяли при подсчете лейкоцитарной формулы на 200 последовательно встречающихся лейкоцитов с дальнейшим пересчетом на 100 (нормобласты/100 лейкоцитов).

Колониеобразующую активность лейкоцитарной фракции ПК определяли при помощи культивирования в течение 14 суток в метилцеллюлозе (готовая среда, содержащая факторы роста «MethoCult 4338, StemCell Technologies, Canada) с подсчетом количества КОЕ-mix, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э.

- Эффективность клонирования (ЭК) определяли как общее число КОЕ на  $1 \times 10^5$  эксплантированных клеток.
- Для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл ПК, полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови.
- Исследование степени некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов ПК проводили при помощи проточной цитофлюориметрии двумя методами: определение количества клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК при окрашивании Propidiumiodid (PI), и определение числа локусов связывания мембранного фосфатидил-серина в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием Annexin V FITC («PharMingen»), согласно инструкциям производителей.
- Результаты реакции анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США). Степень спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов клеток ПК определяли как сумму PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup> и PI<sup>-</sup>/Annexin V<sup>+</sup> клеток, а уровень некроза, как количество PI<sup>+</sup>/Annexin V<sup>-</sup> клеток.

Для количественного определения концентрации G-CSF, IL-8, MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 в сыворотке крови проводилась реакция ИФА «сэндвич» типа. В качестве ферментных меток использовалась пероксидаза. В настоящем исследовании использовались следующие наборы реагентов: «HumanMMP-9 (total)», «Human/mouseMMP-2(total)», «HumanTIMP-2» («Quantikine®» R&DSYSTEMS Inc., USA), «HumanTIMP-1» (Biosource International Inc., USA), «HumanIL-8 ELISAKIT II» (BDOptEIA™ BDBiosciencesPharming, USA).

Статистическую обработку данных проводили для вариационных рядов с параметрическим распределением с помощью однофакторного дисперсионного анализа и оценкой по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони и тесту Ньюмена-Кейлса; для вариационных рядов с непараметрическим распределением с помощью критерия Крускалла-Уоллеса и критерия Манна-Уитни. Для оценки равенства долей использовали Z-тест. Корреляционный анализ проводили с использованием уравнений линейной регрессии и по методу Спирмена для рядов с непараметрическим распределением. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

Учитывая тот факт, что состав клеток ПК в определенной степени является отражением процессов, протекающих во время беременности и родов, в настоящем исследовании предпринята попытка охарактеризовать состав ПК у доношенных новорожденных при различных состояниях и особенностях течения беременности и родов, которые могут влиять на адаптацию плода к процессу родов. Результаты исследования морфологического состава ПК при помощи автоматического гематологического анализатора представлены в табл. 3.

Основными отличиями ПК от крови взрослого являются большее содержание лейкоцитов, наличие нормобластов и большая осмотическая резистентность эритроцитов (SolvesP., 2005; BradleyM.B., 2005). Количественное содержание нормобластов, определенное при помощи световой микроскопии оказалось  $5,62 \pm 0,33/100$  лейкоцитов ( $n=339$ ).



Клеточный состав ПК (M± m) (n=1004)

WBC ( $\times 10^9/\text{л}$ )	NEU (%)	NEU ( $\times 10^9/\text{л}$ )	LYM (%)	LYM ( $\times 10^9/\text{л}$ )	MON (%)	MON ( $\times 10^9/\text{л}$ )
17,24 ± 0,16	48,48 ± 0,25	8,41 ± 0,10	32,45 ± 0,22	5,54 ± 0,06	14,02 ± 0,11	2,42 ± 0,03
EOS (%)	EOS ( $\times 10^9/\text{л}$ )	BAS (%)	BAS ( $\times 10^9/\text{л}$ )	RBC ( $\times 10^9/\text{л}$ )	HGB (г/л)	HCT (%)
3,83 ± 0,06	0,64 ± 0,01	1,22 ± 0,02	0,23 ± 0,01	4,40 ± 0,01	157,4 ± 0,46	32,29 ± 0,14
MCV (фл)	MCH (пг)	MCHC (г/л)	RDW (%)	PLT ( $\times 10^9/\text{л}$ )	MPV (фл)	
105,81 ± 0,12	35,82 ± 0,04	338,6 ± 0,24	12,71 ± 0,02	307,54 ± 1,97	7,18 ± 0,02	

Количество CD34+клеток в ПК определялось с помощью проточной цитометрии и оценивалось как 2 параметра: процент от общего количества лейкоцитов и абсолютное количество CD34+клеток в 1 мл ПК (табл. 4).

Таблица 4.

#### Количество CD34<sup>+</sup>клеток в ПК доношенных новорожденных

Параметры	CD34 (%)	CD34 ( $10^3/\text{мм}^3$ )
Количество наблюдений	618	618
Среднее значение	0,827	0,100
Медиана	0,700	0,078
Стандартное отклонение	0,562	0,079
Стандартная ошибка среднего	0,023	0,003
Минимальное значение	0,120	0,009
Максимальное значение	4,520	0,714

Степень спонтанного апоптоза и пролиферативный потенциал – это противоположные процессы, поддерживающие стабильность клеточного состава, и, как

следствие, нормальное функционирование любой биологической системы. Следовательно, эти процессы, при адекватной способности организма реагировать на внешние и внутренние раздражители, предположительно, должны быть однонаправленными. Чтобы обеспечить компенсацию повышения гибели клеток, биологическая система должна усилить процессы деления и созревания клеток, напротив, при повышенной пролиферации клеток необходимо обеспечить их адекватное «умирание», чтобы клеточная масса не вышла из-под контроля (Абдуллаев Р.Т., 2006; Румянцев С.А., 2006). В работе определена степень некроза и спонтанного апоптоза клеток ПК. Показано, что во всей исследованной группе образцов ПК (n=1004), степень некроза лейкоцитов ПК составила  $3,49 \pm 0,28$  %, при этом, степень некроза лимфоцитов была ниже значений всех лейкоцитов ( $2,99 \pm 0,34$  %) и статистически значимо отличалась от степени некроза моноцитов и гранулоцитов, составившей  $5,59 \pm 0,72$  % и  $6,12 \pm 0,65$  % соответственно ( $p < 0,0001$ ) (рис. 1). Степень спонтанного апоптоза лейкоцитов составила  $9,18 \pm 1,19$  %, при этом степень спонтанного апоптоза лимфоцитов была также ниже значений в общей группе ( $4,32 \pm 0,7$  %), и также статистически значимо отличалась от степени спонтанного апоптоза моноцитов и гранулоцитов, составившей  $15,35 \pm 2,02$  % и  $28,22 \pm 2,51$  % соответственно ( $p < 0,0001$ ) (рис. 1) и не отличалась от показателей периферической крови здоровых доноров.

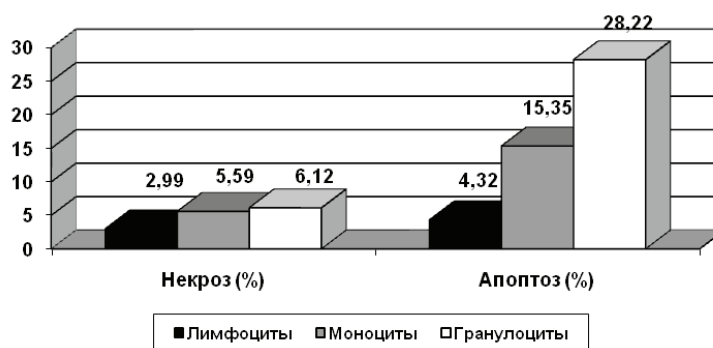


Рисунок 1. Степень некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов ПК.

Такое соотношение показателей позволяет предположить большую жизнеспособность лимфоцитов, что представляется позитивным результатом, учитывая тот факт, что популяция гемопоэтических стволовых клеток нахо-

дится в пуле лимфоцитов. Это предположение подтверждается положительной корреляционной взаимосвязью количества лимфоцитов и колониеобразующей активности ПК (табл. 5).



Таблица 5

**Взаимосвязь количества лимфоцитов и колониеобразующей активности ПК**

Параметр	Количество лимфоцитов	
	г	р
КОЕ-ГЕММ	0,399	0,0001
КОЕ-ГМ	0,4993	0,0001
КОЕ-Г	0,4467	0,0001
КОЕ-М	0,4995	0,0001
КОЕ-Э	0,2068	0,0018
Суммарное количество КОЕ	0,5634	0,0001

В работе обнаружены различия клеточного состава ПК в зависимости от пола и массы тела новорожденного, совпадающие с данными литературы (Caigo M.S., 2005; Aravita S., 2005). Результаты исследования количества клеток и их основных параметров при помощи автоматического гематологического анализатора проанализированы в ПК 1004 доношенных новорожденных. При анализе половых различий отмечено, что у мальчиков уровень лейкоцитов выше ( $17,74 \pm 0,24 \times 10^9/\text{л}$ ;  $M \pm m$ ), чем у девочек ( $16,8 \pm 0,23 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p=0,005$ ), преимущественно за счет нейтрофилов, которых у мальчиков больше, а лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов меньше (табл. 6).

Таблица 6

**Количество лейкоцитов в зависимости от пола новорожденного**

Пол		WBC ( $\times 10^9/\text{л}$ )	Лейкоцитарная формула (%)				
			NEU	LYM	MON	EOS	BAS
Мальчики	N	524	524	524	524	524	524
	$M \pm m$	$17,74 \pm 0,24$	$49,97 \pm 0,35$	$31,57 \pm 0,31$	$13,75 \pm 0,15$	$3,48 \pm 0,07$	$1,26 \pm 0,03$
Девочки	N	480	480	480	480	480	480
	$M \pm m$	$16,80 \pm 0,23$	$47,10 \pm 0,34$	$33,23 \pm 0,30$	$14,29 \pm 0,17$	$4,16 \pm 0,09$	$1,18 \pm 0,03$
<i>P</i>		0,005	< 0,001	< 0,001	0,018	< 0,001	0,06
Пол		WBC ( $\times 10^9/\text{л}$ )	Лейкоцитарная формула ( $\times 10^9/\text{л}$ )				
			NEU	LYM	MON	EOS	BAS
Мальчики	N	524	524	524	524	524	524
	$M \pm m$	$17,74 \pm 0,24$	$8,93 \pm 0,14$	$5,53 \pm 0,09$	$2,44 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,01$
Девочки	N	480	480	480	480	480	480
	$M \pm m$	$16,80 \pm 0,23$	$7,94 \pm 0,12$	$5,54 \pm 0,09$	$2,40 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$
<i>P</i>		0,005	< 0,001	0,938	0,537	< 0,001	0,158

Количество эритроцитов ( $4,33 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$ ) и содержание гемоглобина ( $155,1 \pm 0,7$  г/л) у девочек меньше, чем у мальчиков ( $4,46 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$ ;  $159,5 \pm 0,6$  г/л;  $p < 0,0001$ ). Гематокрит у девочек ( $31,79 \pm 0,2$  %) также меньше, чем у мальчиков ( $32,76 \pm 0,19$  %;  $p=0$ ). Различий в эритроцитарных индексах (MCV, MCH, MCHC, RDW) в зависимости от пола новорожденного не обнаружено. Количество тромбоцитов у девочек ( $314,87 \pm 2,98 \times 10^9/\text{л}$ ) больше, чем у мальчиков ( $300,72 \pm 2,62 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p < 0,0001$ ). Средний размер тромбоцитов не имеет различий. Из 611 новорожденных, для которых были получены данные относительно количества CD34+клеток в ПК, мальчиков было 314 (51,39%), девочек – 297 (48,61%). При сравнении полученных результатов выявлено, что у мальчиков CD34+клеток больше в процентном ( $0,88 \pm 0,03$  – мальчики;  $0,77 \pm 0,03$  – девочки;  $p=0,01$ ) и в абсолютном количестве ( $0,106 \pm 0,005$  – мальчики;  $0,095 \pm 0,005$  – девочки;  $p=0,002$ ).

При анализе данных колониеобразующей активности ПК выявлено, что у мальчиков статистически значимо больше количество КОЕ-ГМ в 1 мл ПК ( $745,71 \pm 65,11$  – девочки;  $1216,7 \pm 185,45$  – мальчики;  $p=0,022$ ), и имеется тенденция к увеличению (статистически незначимо) количества КОЕ-М ( $691,64 \pm 78,6$  – девочки;  $1052,1 \pm 252,09$  – мальчики;  $p=0,19$ ) и общего количества колоний ( $4883,13 \pm 455$  – девочки;  $6070,8 \pm 691$  – мальчики;  $p=0,16$ ) в 1 мл образца ПК. При анализе эффективности клонирования (на 105MNC) у мальчиков также больше КОЕ-Г ( $18,44 \pm 1,31$  – девочки;  $22,42 \pm 1,6$  – мальчики;  $p=0,058$ ).

В процентном соотношении имеется тенденция к увеличению количества КОЕ-ГЕММ ( $p=0,11$ ) у девочек, и уменьшению у них КОЕ-ГМ ( $p=0,13$ ) и КОЕ-Э ( $p=0,14$ ).

Можно предположить, что выявленные различия клеточного состава ПК в зависимости от пола новорожденного связаны с тем, что новорожденные мальчики крупнее новорожденных девочек. Действительно, средняя масса тела при рождении была несколько выше у мальчиков ( $3629,24 \pm 18,25$ г; диапазон 2270-5000г), чем у девочек ( $3467,23 \pm 18,17$ г; диапазон 2300-4650г) ( $p < 0,0001$ ). При разделении на группы по массе тела при рождении мальчиков было больше в группе с массой тела > 4000 г ( $p=0,001$ ), а девочек в группе 2500-3000 г ( $p=0,008$ ). Однако, при исследовании групп, сходных по массе тела при рождении, различия в параметрах крови между мальчиками и девочками сохранялись. Таким образом, различия в клеточном составе ПК в зависимости от пола не могут быть объяснены различной массой тела мальчиков и девочек при рождении.

Различия клеточного состава ПК и крови новорожденного первых суток, у которого отмечается снижение количества многих клеточных элементов, позволяют предположить, что повышенное содержание многих клеточных элементов в ПК может быть следствием мобилизации, сходной с мобилизацией периферической крови взрослых, вызванной адаптацией к процессу родов, а различия количества клеток ПК в зависимости от пола новорожденного – различной способностью девочек и мальчиков



адаптироваться к процессу родов. Исходя из этого предположения, могут быть оценены многие особенности течения беременности и родов, как причины усиления или ослабления родового стресса. Известно, что прохождение плода по естественным родовым путям является более сильным стрессовым фактором по сравнению с оперативными родами путем кесарева сечения. При сравнении показателей ПК в зависимости от способа родоразрешения показано, что при оперативных родах путем кесарева сечения наблюдается меньшее количество лейкоцитов ( $14,29 \pm 0,57 \times 10^9/\text{л}$  против  $17,38 \pm 0,17 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p < 0,0001$ ), за счет меньшего количества нейтрофилов ( $p < 0,0001$ ), лимфоцитов ( $p = 0,02$ ), моноцитов ( $p = 0,003$ ) и эозинофилов ( $p = 0,002$ ). Также при оперативных родах отмечается меньшее количество эритроцитов ( $4,3 \pm 0,05 \times 10^{12}/\text{л}$  против  $4,4 \pm 0,01 \times 10^{12}/\text{л}$ ;  $p = 0,04$ ) и тромбоцитов ( $284,88 \pm 9,55 \times 10^9/\text{л}$  против  $308,59 \pm 2,01 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p = 0,015$ ). MPV при этом имеет статистически значимо большее значение ( $p = 0,039$ ). Доля мальчиков и девочек в группах оперативных и физиологических родов не отличалась (табл. 2). При исследовании групп мальчиков и девочек по отдельности все вышеописанные различия для способов родоразрешения сохранялись.

Известно, что повторные роды проходят с меньшей нагрузкой для плода, поскольку родовые пути более приспособлены для его прохождения. Установлено, что при уве-

личении паритета уменьшается количество лейкоцитов в ПК ( $18,14 \pm 0,22 \times 10^9/\text{л}$  – первые роды;  $16,22 \pm 0,25 \times 10^9/\text{л}$  – 2-е;  $15,44 \pm 0,61 \times 10^9/\text{л}$  – 3-и и  $15,1 \pm 1,37 \times 10^9/\text{л}$  – 4-е и более;  $p < 0,0001$ ). Также уменьшается абсолютное количество нейтрофилов ( $с 8,91 \pm 0,13 \times 10^9/\text{л}$  при первых родах до  $6,86 \pm 0,65 \times 10^9/\text{л}$  при 4-х;  $p < 0,0001$ ); абсолютное количество лимфоцитов ( $с 5,8 \pm 0,09 \times 10^9/\text{л}$  при первых родах до  $5,17 \pm 0,58 \times 10^9/\text{л}$  при 4-х;  $p < 0,0001$ ); абсолютное количество моноцитов ( $с 2,54 \pm 0,04 \times 10^9/\text{л}$  при первых родах до  $2,1 \pm 0,09 \times 10^9/\text{л}$  при 3-х;  $p < 0,0001$ ) и абсолютное количество базофилов ( $с 0,24 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$  при первых родах до  $0,16 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$  при 3-х;  $p = 0,017$ ), что подтверждает гипотезу о снижении стрессового воздействия при последующих родах. Параметры красной крови и тромбоцитов в зависимости от паритета не изменялись. Процент мальчиков и девочек среди групп, составленных по паритету, не отличался. При исследовании групп, составленных только из девочек и мальчиков, различия сохранялись, что исключает влияние пола новорожденного на различия клеточного состава ПК в зависимости от паритета.

Количество CD34+клеток повторяет закономерности, обнаруженные для лейкоцитов ПК. Обнаружена тенденция к уменьшению процентного содержания и статистически значимое уменьшение абсолютного количества CD34+ клеток при четвертых и более родах (рис. 2).

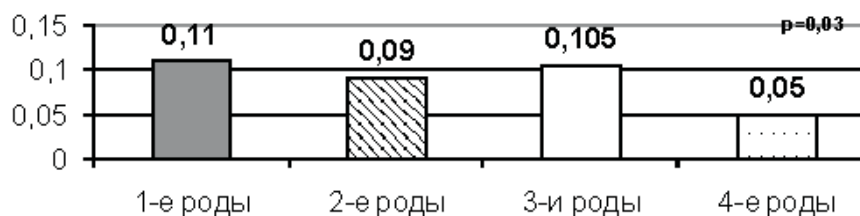


Рисунок 2. Количество CD34+ клеток ПК в зависимости от паритета.

При сравнении количества CD34+клеток в ПК при физиологических и оперативных родах статистически значимых различий не получено. Тенденция к уменьшению абсолютного количества CD34+клеток в ПК при родах путем кесарева сечения, вероятно, связана с уменьшением общего количества лейкоцитов в данной группе.

#### *Особенности реакции ПК доношенных новорожденных при различных состояниях острой и хронической гипоксии плода*

Гипоксия является мощным стрессовым фактором, и, предположительно, должна приводить не только к повышению количества эритроцитов с компенсаторной целью, но и к повышению количества других клеток крови, как следствие цитокиновой мобилизации в ответ на стресс. В работе были проанализированы ряд состояний острой и хронической гипоксии плода. Установлено, что при острой гипоксии повышается количество эритроцитов  $4,55 \pm 0,05 \times 10^{12}/\text{л}$  против  $4,35 \pm 0,02 \times 10^{12}/\text{л}$  ( $p < 0,0001$ ) концентрация гемоглобина –  $162,2 \pm 1,7$  г/л против  $156,1 \pm 0,9$  г/л ( $p = 0,001$ ), уровень гематокрита –  $32,98 \pm 0,46$  % против  $31,86 \pm 0,24$  % ( $p = 0,027$ ). Количество CD34+клеток статистически значимо выше при острой и ниже при

хронической внутриутробной гипоксии плода. При внутриутробной гипоксии повышается как эффективность клонирования, так и уровень спонтанного апоптоза лейкоцитов ПК. При острой гипоксии плода жизнеспособность лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток ПК не изменяется. При повышении степени зрелости плаценты, эффективность клонирования имеет тенденцию к снижению, а степень спонтанного апоптоза к повышению.

Внутриутробная гипоксия приводит к увеличению количества нормобластов в ПК –  $11,94 \pm 3,11/100$  лейкоцитов против  $5,42 \pm 0,53/100$  лейкоцитов ( $p < 0,0001$ ). Увеличения количества нормобластов в ПК при острой гипоксии в родах не выявлено  $6,21 \pm 0,66/100$  лейкоцитов против  $5,32 \pm 1,25/100$  лейкоцитов ( $p = 0,55$ ). На количество нормобластов влияет только состояние хронической гипоксии плода. Состояние острой гипоксии плода не отражается повышением количества нормобластов в ПК, поскольку система кроветворения не успевает ответить пролиферацией эритроидных предшественников. В 206 образцах ПК было подсчитано количество нормобластов и определено количество CD34+клеток. Образцы были поделены на 2 группы: менее 15 нормобластов на 100 лейкоцитов и более 15 нормобластов на 100 лейкоцитов. При сравнении





получены статистически значимые различия в абсолютном количестве CD34<sup>+</sup> клеток в ПК (0,11±0,007 – при менее 15 нормобластов; 0,17±0,032 – при более 15 нормобластов;  $p=0,034$ ). При проведении регрессионного анализа получена достоверная положительная корреляционная взаимосвязь абсолютного количества CD34<sup>+</sup>клеток в ПК и количества нормобластов в ПК ( $r=0,3352$ ;  $p=0,001$ ). Кроме того, получена статистически значимая положительная корреляционная взаимосвязь между количеством нормобластов в ПК и количеством предшественников миелоидного ростка кроветворения – КОЕ-ГМ ( $r=0,6778$ ;  $p=0,0004$ ), КОЕ-Г ( $r=0,7833$ ;  $p=0,00001$ ) и КОЕ-М ( $r=0,7811$ ;  $p=0,00001$ ), а также суммарным количеством КОЕ ( $r=0,6367$ ;  $p=0,0011$ ). Таким образом, обнаруженное рядом авторов (Rubinstein P. et. al., 2005), влияние количества нормобластов в ПК на скорость приживания миелоидного ростка кроветворения после трансплантации стволовых гемопоэтических клеток ПК нашло биологическое подтверждение в нашей работе.

*Механизм формирования клеточного состава пуповинной крови*

Известно, что ПК не может отождествляться с кровью новорожденного даже в первые часы жизни, поскольку особенности клеточного состава ПК являются быстро проходящими последствиями процесса родов, а сыворотка ПК обладает выраженной цитокиновой активностью (Baillie K.E. et al., 1994). Если рассматривать ПК с точки зрения идентичного механизма мобилизации при помощи того же набора цитокинов, как при мобилизации периферической крови в постнатальном периоде, то, вероятно, такая картина может натолкнуть на мысль, что особенности течения беременности и родов, усиливающие родовой стресс, должны сопровождаться более высокими концентрациями мобилизующих цитокинов.

При сравнении концентрации Г-КСФ в периферической крови и в ПК оказалось, что в ПК концентрация

Г-КСФ составляет 44,8±12,2 пг/мл (n=45), что превышает нормальную концентрацию сывороточного Г-КСФ в периферической крови. Таким образом, концентрация Г-КСФ в сыворотке ПК доношенных новорожденных, отличающаяся от нормальной концентрации Г-КСФ в сыворотке здоровых доноров, что в сочетании с данными, свидетельствующими об увеличении количества лейкоцитов и CD34+клеток в ПК при наличии ряда осложнений беременности и родов, а также физиологических состояний при нормальном течении родов, удлиняющих родовой процесс, позволяет предположить изменение уровня других цитокинов и ферментов, участвующих в Г-КСФ индуцированной мобилизации лейкоцитов и CD34+клеток. При изучении уровня IL-8 в сыворотке ПК было показано, что концентрация IL-8 в сыворотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров, тогда как концентрация MMP-9 и MMP-2 в сыворотке ПК не отличалась от таковой в крови здоровых доноров (табл. 7).

Таблица 7.

**Концентрация цитокинов в сыворотке ПК и здоровых доноров (пг/мл)**

Исследуемый цитокин	Исследуемые группы		p
	ПК (n=45)	Доноры (n=25)	
IL-8	19,83 ± 4,93	6,07 ± 0,39	0,022
MMP-9	182,4 ± 23,7	225,4 ± 33,6	0,521
MMP-2	114,6 ± 36,4	96,3 ± 27,8	0,622
G-CSF	44,8 ± 12,2	21,7 ± 8,6	0,042

Несмотря на отсутствие различий в концентрации основных мобилизующих цитокинов между ПК и кровью здоровых доноров, при ряде состояний, усиливающих родовой стресс, обнаружено повышение концентрации IL-8, MMP-9 и G-CSF (табл. 8).

Таблица 8

**Концентрация цитокинов в сыворотке ПК при некоторых особенностях течения беременности и родов (пг/мл)**

Фактор	Цитокин	Пуповинная кровь (n=45)		p
		Наличие фактора	Отсутствие фактора	
		Гипоксия (n=6)	Без гипоксии (n=31)	
Внутриутробная гипоксия плода	IL-8	21,87 ± 16,44	17,62 ± 5,73	0,761
	MMP-9	192,4 ± 48,2	166,4 ± 24,8	0,598
	G-CSF	49,1 ± 27,3	39,8 ± 14,1	0,740
Острая гипоксия плода		Гипоксия (n=8)	Без гипоксии (n=31)	
	IL-8	56,21 ± 14,17	17,62 ± 5,73	0,006
	MMP-9	232,4 ± 39,4	116,4 ± 24,8	0,035
Пол новорожденного		Мальчики (n=16)	Девочки (n=15)	
	IL-8	26,32 ± 6,81	16,43 ± 4,89	0,253
	MMP-9	194,1 ± 28,7	176,4 ± 24,8	0,646
Способ родоразрешения		Самопроизвольные роды (n=22)	Плановое кесарево сечение (n=9)	
	IL-8	20,62 ± 6,82	12,14 ± 3,88	0,449
	MMP-9	201,8 ± 32,3	93,2 ± 44,2	0,071
	G-CSF	48,2 ± 16,2	32,6 ± 18,8	0,584



Такое соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с количеством CD34+ клеток в результате мобилизации и в ПК позволяет предположить, что хотя адаптация плода к процессу родов и позволяет

объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда анте- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ivanovic Z, Belloc F, Faucher J-L et al. Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34+ murine bone marrow cells // *ExpHematol.* – 2002. – №30. – P.67-73.
- Ivanovic Z, DelloSbarba PD, Trimoreau F et al. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent // *Transfusion* - 2000. – №40. – P.1482-1488.
- Ivanovic Z, Hermitte F, de la Grange PB, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, Vezon G, Praloran V. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O<sub>2</sub> concentration (3%) // *Stem Cells.* – 2004. – №22(5). – P.716-24.
- Sun B, Bai CX, Feng K, Li L, Zhao P, Pei XT. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells and their response to cytokines // *Sheng Li XueBao.* - 2000 Apr. - №52(2). – P.143-6.
- Brunet De La Grange P, Barthe C, Lippert E, Hermitte F, Belloc F, Lacombe F, Ivanovic Z, Praloran V. Oxygen concentration influences mRNA processing and expression of the cd34 gene // *Cell Biochem.* - 2006 Jan 1. - №97(1). – P.135-44.
- Desplat V, Faucher JL, Mahon FX, DelloSbarba P, Praloran V, Ivanovic Z. Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34(+) CML cells // *Stem Cells.* – 2002. – №20(4). – P.347-54.
- Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H. Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways // *Leukemia.* – 1997. – №11 (Suppl. 3). – P.380-382.
- Ura H, Hirata K, Katsuramaki T. Mechanisms of cell death in hypoxic stress // *Nippon GekaGakkaiZasshi.* – 1999. – №100. – P.656-662.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL // *Cancer Res.* – 1996. – №56. – P.2161-2166.
- Saxonhouse MA, Rimsza LM, Christensen RD, Hutson AD, Stegner J, Koenig JM, Sola MC. Effects of anoxia on megakaryocyte progenitors derived from cord blood CD34pos cells // *Eur J Haematol.* - 2003 Nov. - №71(5). – P.359-65.
- Mang Xiao, Douglas C. Dooley: Assessment of Cell Viability and Apoptosis in Human Umbilical Cord Blood Following Storage // *Journal of Hematotherapy& Stem Cell Research.* - Feb 2003. - Vol. 12, No. 1. – P.115-122.
- Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomaki R. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex // *Transfusion.* - 2005 Apr. - №45(4). – P.613-21.
- Maconi M, Rolfo A, Cardaropolo S, Brini M, Danise P. Haematologic values in healthy and small for gestational age newborns // *Lab hematol.* – 2005. – №11(2). – P.152-6.
- McCarthy JM, Capullari T, Thompson Z, Zhu Y, Spellacy WN. Umbilical cord nucleated red blood cell counts: normal values and the effect of labor // *J Perinatol.* - 2006 Feb. - №26(2). – P.89-92.
- Perri T, Ferber A., Digli A., Rabizadeh E., Weissmann-Brenner A., Divon MY. Nucleated Red Blood Cells in Uncomplicated Prolonged Pregnancy // *Obstetrics Gynecology.* – 2004. – №104. – P.372-376.

ПОСТУПИЛА: 18.10.2010



**Ибрагимов Р.Ш.<sup>1</sup>, Райкина Е.В.<sup>1</sup>, Осипова Е.Ю.<sup>1,2</sup>, Майорова О.А.<sup>1</sup>,  
Яковлева М.В.<sup>2</sup>, Румянцев С.А.<sup>1</sup>**

## **КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ПУПОВИННОЙ И Г-КСФ МОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии  
Минздрава России

Россия, 117997, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117/2. E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru

<sup>2</sup>Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы  
Россия, 115516, Москва, Бакинская ул., 31

Клеточный состав пуповинной крови является быстропроходящим следствием родового стресса и напоминает клеточный состав периферической крови взрослых, полученной в результате мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ), реализующим свое биологическое действие путем ряда вторичных посредников, многие из которых являются также естественными эффекторами стрессового состояния. В настоящем исследовании продемонстрирована сравнительная характеристика клеточного состава, в том числе субпопуляций лимфоцитов, CD34+ и CD133+ клеток, колониобразующей активности гемопоэтических клеток-предшественников, а также концентраций мобилизующих цитокинов (IL-8, MMP-2, MMP-9) в пуповинной крови доношенных новорожденных и периферической крови после мобилизации при помощи Г-КСФ.

Соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с количеством CD34+клеток в результате мобилизации и в ПК позволяет предположить, что хотя родовой стресс и позволяет объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда ante- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

*Ключевые слова:* пуповинная кровь, мобилизация, CD34+клетки, CD133+клетки, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

**Ibragimov R.Sh.<sup>1</sup>, Raikina E.V.<sup>1</sup>, Osipova E.Yu.<sup>1,2</sup>, Maiorova O.A.<sup>1</sup>, Yakovleva M.V.<sup>2</sup>,  
Roumiantsev S.A.<sup>1</sup>**

## **CELL COMPOSITION OF CORD BLOOD AND G-SCF-MOBILIZED BLOOD TRANSPLANTATIONAL MATERIAL**

<sup>1</sup>Federal Research Center of pediatric hematology, oncology and immunology  
117/2 Leninskiy pr., Moscow. 117997, Russia. E-mail: s\_roumiantsev@mail.ru

<sup>2</sup>Moscow stem cell bank  
31 Bakinskaya st., Moscow, 115516, Russia

Cord blood cell composition is a short-lasting delivery stress consequence and is similar on adult G-CSF-mobilized peripheral blood. G-SCF realizes biological effect by number of secondary messengers, many of which are also natural effectors of stress. In this research comparative characteristics of cell composition, including lymphocytes subpopulations, CD34+ and CD133+ cells, hematopoietic progenitor cells colony-forming activity and mobilizing cytokines concentration (IL-8, MMP-2, MMP-9), between term newborns cord blood and G-SCF-mobilized peripheral blood is shown.

Mobilized cytokines concentration ratio in combination with CD34+ cells count in cord blood and mobilized peripheral blood suggests that delivery stress possibly is not single cause of cord blood features.

*Keywords:* Cord blood, mobilization, CD34+cells, CD133+cells, granulocyte colony stimulated factor (G-CSF).



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Известно, что пуповинная кровь не может отождествляться с кровью новорожденного даже в первые часы жизни, поскольку особенностями клеточного состава ПК являются быстропроходящими последствиями родового стресса, а сыворотка ПК обладает выраженной цитокиновой активностью [1]. Учитывая тот факт, что состав мобилизованной при помощи препаратов Г-КСФ крови в значительной степени отличается от физиологического состояния, что обусловлено действием множества вторичных посредников, многие из которых являются также естественными эффекторами стрессового состояния, представляется интересным сравнить клеточный состав ПК с кровью доноров после применения препаратов Г-КСФ.

Ранее было показано, что экспрессия рецептора к Г-КСФ (CD114), через который реализуется эффект Г-КСФ на клетку, на поверхности CD34+клеток очень невелика и составляет 4-5%. [2-5]. Такой уровень экспрессии рецептора к Г-КСФ дает основания предполагать, что Г-КСФ не оказывает непосредственного влияния на CD34+клетки, а действие его опосредовано другими клетками, несущими на поверхности CD114. Гранулоциты и в меньшей степени моноциты имеют большое количество рецептора к Г-КСФ и, вероятно, являются основными мишенями для реализации биологического действия Г-КСФ в организме. Динамика количества клеток в результате использования Г-КСФ демонстрирует нарастание доли CD15+CD114+клеток и уменьшение доли CD14+CD114+клеток за счет более интенсивного роста гранулоцитов в ответ на Г-КСФ во всех исследованных группах [2,3].

Известно, что повышение количества CD34+клеток в периферической крови может быть результатом действия других цитокинов [7-14]. В последнее время появились данные о мобилизации CD34+клеток под действием интерлейкина 8 (IL-8). Так, в исследовании Ruijt JF et al. [11] на макаках Резус показано, что IL-8 стимулирует быстрое нарастание уровня фермента матрикс-металлопротеиназы-9 параллельно со значительным повышением количества CD34+клеток в периферической крови. В свою очередь, в исследовании Watanabe T et al. показано, что при мобилизации CD34+клеток при помощи Г-КСФ в сыворотке крови происходит 20-кратное повышение уровня IL-8, при отсутствии изменений в концентрации других исследованных цитокинов (MIP-1α, TNF-α, IFN-γ) [15].

Эти данные позволяют высказать предположение, что в ответ на связывание Г-КСФ с рецептором, зрелые гранулоциты индуцируют секрецию IL-8, который, в свою очередь, вызывает повышение уровня в крови MMP-9, разрушающей молекулы адгезии, фиксирующие CD34+клетки к строме костного мозга, и приводящей, таким образом, к выходу CD34+клеток в периферическую кровь.

Таким образом, Г-КСФ, вероятно, не оказывает прямого воздействия на гемопоэтические стволовые клетки, реализуя свой эффект мобилизации CD34+клеток через клетки-мишени, имеющие рецепторы к Г-КСФ, которыми являются нейтрофильные гранулоциты и, возможно, моноциты [9-11,16]. Эти клетки, в свою очередь, получив сигнал от Г-КСФ, инициируют выработку вторичных посредников, которыми могут быть другие цитокины (IL-8, IL-3, GM-CSF, SDF-1) или ферменты (коллагеназы), которые разрушают связь CD34+клеток со стромальными элементами костного мозга и усиливают миграцию CD34+клеток в периферическую кровь [2,11].

**Материалом исследования служили:**

Пуповинная кровь 1013 доношенных новорожденных, родившихся на 37-41 неделе гестации (медиана составила 40 недель) в ЦПСИР ДЗ г. Москвы (гл. врач – д.м.н., проф. Курцер М.А.) и Родильном доме №10 Управления здравоохранения ЮЗАО г. Москвы (гл. врач – Оземковская Е.П.) за период с 2005 по 2008 год.

Концентрат ПК (n=1013), полученный при помощи седиментации эритроцитов раствором гидроксипропилкрахмала (HES) в ГУЗ «Банк стволовых клеток» ДЗ г. Москвы за период с 2005 по 2008 год.

Материал мобилизации CD34+клеток крови и кровь 23 здоровых доноров ГСК, которые получали препараты Г-КСФ с целью мобилизации CD34+клеток в периферическую кровь для сбора и последующей аллогенной трансплантации в ФГУ «ФНКЦ ДГОИ» Росздрава за период с 2000 по 2008 год.

**Получение пуповинной крови.**

Пуповинную кровь получали при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37-41 недель гестации (медиана – 40 недель)) с учетом информированного согласия матери и отсутствия стандартных противопоказаний. После пережатия и пересечения пуповины, производили пункцию сосудов пуповины специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA. Сбор крови осуществляли в течение 2-15 минут после родов (менее 5 минут – 849 случаев (84,4%), от 5 до 10 минут – 90 случаев (8,7%) и более 10 минут – 69 (6,9%)), до отделения плаценты (n=998 (98,5%)). В случае сбора крови после отделения плаценты (n=15 (1,5%)), плацента помещалась в специальную стерильную стойку и проводилась аналогичная процедура сбора ПК. Полученный материал хранили в темном месте при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 18 часов после процедуры сбора ПК.

**Процедура получения концентрата клеток пуповинной крови.**

Выделение клеточного концентрата, содержащего стволовые клетки, проводилось в асептических условиях, в «чистом» помещении класса D ГУЗ Банк стволовых клеток ДЗМ за период 2005-2008 годы двумя методами: методом двойного центрифугирования и аппаратным методом с помощью аппарата «SepaxS100», Biosafe, Switzerland (539 и 554 образца, соответственно).

Исходный рабочий протокол метода двойного центрифугирования был разработан Нью-Йоркским банком пуповинной крови (P. Rubinstein et al. 1995) Международные стандарты сбора, обработки, тестирования, хранения и отбора пуповинной крови при использовании роботизированного криокомплекса «BioArchive», ThermoGenesis, USA утверждены FDAUSA, NetCord и FАHCT. Плазмоэкстракция проводилась при помощи автоматического плазмоэкстрактора «AutoVolumeExpressor», ThermoGenesis, USA. Введение криопротектора - Диметилсульфоксида (DMSO) – осуществлялось с помощью шприцевого насоса TE-331, TerumoTerufusion, Belgium

Метод автоматического выделения с использованием аппарата «SepaxS100», Biosafe, Switzerland и криокомплекса «BioArchive», ThermoGenesis. Аппарат для сепарации клеток управляется компьютерной программой, в основу



которой заложен принцип спектрометрического анализа фракций крови, а также принцип двойного центрифугирования. Во время первого кровь разделяется на три фракции – клеточная плазма, 1-я порция лейкоцитарного концентрата и эритроциты; во время второго происходит разделение на бесклеточную плазму, 2-ю порцию лейкоцитарного концентрата и остаточные эритроциты. Для обработки пуповинной крови этим методом использовались комплекты для автоматической обработки пуповинной крови “SepaxCS-530”, Biosafe, Switzerland. DMSO вводилось при помощи аппарата для перемешивания и охлаждения концентрата пуповинной крови “CoolmixAS-210”, Biosafe, Switzerland.

Все обработанные образцы были подвергнуты криоконсервации в роботизированном криокомплексе “BioArchive”, ThermoGenesis, USA. Непосредственно перед криоконсервацией, в каждый образец добавлялся криопротектор DMSO в смеси с декстраном-40 в количестве 20% от объема конечного продукта для предотвращения разрушения клеток концентрата пуповинной крови под воздействием сверхнизких температур. Затем концентрат помещался в металлическую канистру и погружался в программном замораживателе криокомплекса в пары азота для предварительного охлаждения и его предзаморозки по заданному температурному профилю до  $-50^{\circ}\text{C}$ . Процесс начинается с охлаждения до  $-1^{\circ}\text{C}$ . Затем следует этап предзаморозки со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-11^{\circ}\text{C}$ . Конечным этапом является постзаморозка со скоростью  $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-50^{\circ}\text{C}$ . Данный профиль, полученный экспериментальным путем фирмой-производителем ThermoGenesis, USA совместно с Нью-Йоркским банком пуповинной крови, контролируется программно. Затем канистра с образцом автоматически погружается криокомплексом в жидкий азот с температурой  $-196^{\circ}\text{C}$  в заранее автоматически выбранную пустую ячейку для бессрочного хранения. Каждая ячейка имеет свой индивидуальный адрес хранения.

#### **Определение клеточного состава пуповинной крови.**

Подсчет клеток крови производился двумя методами:

1) все 1013 образцов пуповинной крови были подвергнуты анализу автоматическим счетчиком клеток крови ABX Pentra 60 C+ в режиме автоматической аспирации с определением 26 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов по объему, двумерную диаграмму, отражающую плотность популяции лейкоцитов и ее состав, а так же дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам – лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, выявление атипичных лимфоцитов (ALY), больших незрелых клеток (LIC) и нормобластов (NRBC);

2) для точной морфологической характеристики клеток пуповинной крови использовали мазки пуповинной крови, окрашенные по методу Папшенгейма-Крюкова (комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая-Грюнвальда и краской Романовского). Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоцитарная формула) проводился при использовании иммерсионных объективов ( $\times 40$  и  $\times 100$ ). При подсчете лейкоцитарной формулы анализировали не менее 200 клеток;

Количество нормобластов определяли при подсчете лейкоцитарной формулы на 200 последовательно встречающихся лейкоцитов с дальнейшим пересчетом на 100 (нормобласты/100лейкоцитов).

Определение количества субпопуляций лейкоцитов и стволовых клеток

Количество субпопуляций лейкоцитов и гемопоэтических стволовых клеток определяли по экспрессии мембранных маркеров (CD – clusters of differentiation) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами CD3, CD4, CD8, CD13, CD14, CD16, CD19, CD25, CD30, CD31, CD33, CD34, CD38, CD44, CD45, CD56, CD61, CD62L, CD62E, CD71, CD90, CD106, CD117, CD133, HLA-DR «BectonDickinson», США при помощи проточной цитометрии на приборе FACSCalibur «BectonDickinson», США.

#### **Определение колониеобразующей активности**

Колониеобразующую активность лейкоцитарной фракции пуповинной крови определяли двумя методами:

1. культивирование в течение 14 суток в метилцеллюлозе (готовая среда, содержащая факторы роста «MethoCult 4338, StemCellTehnologies, Canada) с подсчетом количества КОЕ-mix, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э.

• Эффективность клонирования (ЭК) определяли как общее число КОЕ на  $1 \times 10^5$  эксплантированных клеток

• Для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл пуповинной крови, полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови.

2. Культивирование в полутвердой среде в системе «агаровая капля – жидкая среда» в течение 7 суток с расчетом следующих показателей:

• колониеобразующая (КОС) и кластерообразующая (КлОС) способность – число колоний (малые – 20–40 клеток, средние- 41-100 клеток и большие – более 100 клеток) и кластеров (малые – 5-9 клеток, большие – 10-19 клеток) на  $1 \times 10^5$  эксплантированных клеток.

• эффективность клонирования (ЭК) – общее число колоний и кластеров на  $1 \times 10^5$  эксплантированных клеток

• для определения абсолютного количества гемопоэтических предшественников в 1 мл крови или костного мозга, полученные величины эффективности клонирования умножали на число мононуклеарных клеток в 1 мл крови и на число миелокариоцитов в 1 мл костного мозга.

• пролиферативный потенциал (ПП) – отношение числа колоний к кластерам в культуре.

#### **Определение уровня спонтанного апоптоза и некроза клеток**

Определяли уровень некроза и спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов пуповинной крови. Исследование проводили при помощи проточной цитофлюориметрии двумя методами: определение количества клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК при окрашивании Propidiumiodid (PI) и определение числа локусов связывания мембранного фосфатидил-серина в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием Annexin V FITC («PharMingen»), согласно инструкциям производителей.

Результаты реакции анализировали на проточном цитофлюориметре FACScan («BectonDickinson», США). Обработку полученных данных производили при помо-



щи программы WinMDI 2.8 for Windows. Уровень спонтанного апоптоза лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов клеток пуповинной крови определяли как сумму PI+/Annexin V+ и PI-/Annexin V+ клеток, а уровень некроза, как количество PI+/Annexin V- клеток.

Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь.

Для мобилизации CD34+ клеток у здоровых доноров препараты Г-КСФ вводились в дозе 5-10 мкг/кг/сут в течение 5 дней. На пятый день от начала стимуляции проводили первый сеанс цитафереза.

#### Получение CD 34+ клеток периферической крови.

Периферические CD34+ клетки получали с помощью процедуры цитафереза на гемосепараторе «BaxterCS-3000 Plus». Мононуклеарную фракцию клеток крови выделяли на градиенте гравитации. Сепарации всегда подвергали постоянный объем периферической крови (7000 мл), поэтому в зависимости от массы тела, за один сеанс через гемосепаратор проходило более одного объема циркулирующей крови донора. Объем циркулирующей крови (ОЦК) донора определяли по таблицам в зависимости от массы тела и возраста.

#### Иммуноферментный анализ.

Для количественного определения концентрации G-CSF, IL-8, MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 в сыворотке крови проводилась реакция ИФА «сэндвич» типа.

Принцип реакции следующий: антигены исследуемых сывороток реагируют с иммобилизованными на твердой фазе антителами. После удаления избытка смеси в реакцию вводятся меченные ферментом антитела, которые связываются уже иммобилизованным антигеном. В данном случае ферментативная активность находится в прямо пропорциональной зависимости с количеством антигена в исследуемой сыворотке.

В качестве ферментных меток использовали пероксидазу. При действии фермента на хромоген образуется окрашенный продукт, о содержании которого можно судить по оптической плотности фотометрируемого раствора.

В настоящем исследовании использовали следующие наборы реагентов: «HumanMMP-9 (total)», «Human/mouseMMP-2(total)», «HumanTIMP-2» («Quan-tikine®» R&D Systems Inc., USA), «HumanTIMP-1» (Biosource International Inc., USA), «HumanIL-8 ELISAKitII» (BDOptEIA™ BDBiosciencesPharming, USA). К каждому набору прилагалась собственная инструкция для выполнения эксперимента.

#### Статистическая обработка.

Статистическую обработку данных производили для вариационных рядов с параметрическим распределением с помощью однофакторного дисперсионного анализа и оценкой по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони и тесту Ньюмена-Кейлса; для вариационных рядов с непараметрическим распределением с помощью критерия Крускалла-Уоллеса и критерия Манна-Уитни. Для оценки равенства долей использовали Z-тест. Корреляционный анализ проводили с использованием уравнений линейной регрессии и по методу Спирмена для рядов с непараметрическим распределением. При расчетах использовали программы Excel 2002 Pro, STATISTIKA for Windows 8.0, Biostat for Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточный состав пуповинной и Г-КСФ-мобилизованной периферической крови

Сравнение клеточного состава ПК и крови доноров показало, что Г-КСФ мобилизованная периферическая кровь содержит статистически значимо большее количество лейкоцитов за счет статистически значимого большего количества нейтрофилов (табл. 1), в то время как количество эозинофилов и базофилов не различается, а количество лимфоцитов, напротив больше в ПК.

Таблица 1

Клеточный состав Г-КСФ мобилизованной крови и ПК ( $\times 10^9/\text{л}$ )

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	P
	n=1013	n=23	
Лейкоциты	17,24±0,16	32,8±2,2	<0,0001
Нейтрофилы	8,41±0,1	27,6±2,0	<0,0001
Лимфоциты	5,54±0,06	2,9±0,4	<0,0001
Моноциты	2,42±0,03	2,2±0,4	0,28
Эозинофилы	0,64±0,01	1,2±0,21	<0,0001
Базофилы	0,23±0,01	0,17±0,04	0,37

Мобилизованная при помощи Г-КСФ периферическая кровь содержит больше CD3+лимфоцитов и меньше CD16+CD56+ (NK) клеток (табл. 2).

Таблица 2

Содержание субпопуляций лимфоцитов в Г-КСФ мобилизованной и ПК

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	P
	n=62	n=15	
Доля (%) от лимфоцитов			
CD3+	56,03±1,67	67,8±3,04	0,002
CD3+CD4+	39,44±1,4	48,76±2,76	0,004
CD3+CD8+	15,65±0,81	19,27±2,07	0,065
CD19+	14,61±0,62	17,87±3,33	0,115
CD16+CD56+	13,85±1,83	8,62±0,96	0,169
Абсолютное количество ( $\times 10^6/\text{л}$ )			
CD3+	2,07±0,15	2,94±0,08	0,002
CD19+	0,55±0,06	0,56±0,05	0,928
CD3+CD4+	1,44±0,1	1,89±0,07	0,016
CD3+CD8+	0,68±0,07	0,78±0,08	0,453
CD16+CD56+	0,76±0,11	0,36±0,05	0,048

Если рассматривать ПК с точки зрения идентичного механизма мобилизации при помощи того же набора цитокинов, концентрация которых в ПК повышается в ответ на родовой стресс, то, вероятно, такая картина может натолкнуть на мысль, что терапевтическая концентрация Г-КСФ в периферической крови выше, чем в пуповинной и, соответственно, выше уровень остальных цитокинов, участвующих в процессе мобилизации. Тем не менее, количество CD34+клеток в Г-КСФ мобилизованной крови



статистически значимо ниже, чем в ПК (табл. 3), за счет всех исследованных субпопуляций (табл. 4), что дает возможность предположить, что аналог мобилизации в процессе родового стресса является не единственной причиной повышенного количества CD34+клеток в ПК. Это предположение отчасти подтверждается тем, что эффективность клонирования Г-КСФ мобилизованной периферической крови также ниже, чем в ПК, а ГСК, в основном, представлены гранулоцитарно-макрофагальными предшественниками (табл. 5).

Таблица 3

**Количество CD34+клеток в Г-КСФ мобилизованной крови и ПК**

Параметры	CD34 (%)	CD34 (в мм <sup>3</sup> )
Количество CD34+клеток в ПК доношенных новорожденных		
Количество наблюдений	618	618
Среднее значение	0,827 ± 0,023	100 ± 3
Количество CD34+клеток в Г-КСФ мобилизованной периферической крови здоровых доноров		
Количество наблюдений	23	23
Среднее значение	0,24 ± 0,09	44 ± 10
P	p<0,0001	p<0,0001

Таблица 4

**Количество субпопуляций CD34+ и CD133+клеток Г-КСФ мобилизованной крови и ПК**

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	p
	n=47	n=15	
Доля (%) от лимфоцитов			
CD34+CD133+	0,46±0,05	0,09±0,036	<0,0001
CD34+CD133-	0,31±0,02	0,12±0,031	<0,0001
CD34+CD38-	0,77±0,09	0,19±0,042	<0,0001
CD34+CD71+	0,96±0,1	0,22±0,065	<0,0001
CD34+CD62L+	0,59±0,06	0,15±0,045	<0,0001
CD34+CD44+	0,82±0,07	0,26±0,068	<0,0001
CD34+CD117+	0,49±0,05	0,16±0,026	<0,0001
CD34+CD61+	0,45±0,058	0,16±0,53	0,356
CD34+CD38+	0,77±0,086	0,31±0,086	0,006
CD133+CD106+	0,48±0,07	0,1±0,042	0,004
CD133+CD31+	0,88±0,11	0,7±0,24	0,45
Абсолютное количество /мкл			
CD34+CD133+	59±7	3±0,9	<0,0001
CD34+CD61+	58±8	5±1,1	<0,0001
CD34+CD38+	103±16	9±1	0,002
CD34+CD71+	131±20	6±0,9	<0,0001
CD133+CD106+	58±8	3±0,9	<0,0001
CD133+CD31+	116±17	20±2	0,002

**Эффективность клонирования Г-КСФ мобилизованной крови и ПК**

Таблица 5

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	p
	n=226	n=15	
ЭК (105эксплантированныхмоноклеарных клеток)			
Суммарное количество	116,8±4,47	19,2±3,6	<0,0001
КОЕ-ГЕММ	41,95±2,2	1,3±0,6	<0,0001
КОЕ-ГМ	23,22±1,38	7,1±1,2	0,003
КОЕ-Г	20,44±1,04	4,6±0,6	<0,0001
КОЕ-М	15,93±1,14	3,8±0,6	0,007
КОЕ-Э	15,28±1,26	2,0±0,5	0,007
Количество клеток-предшественников в 1 мл			
Суммарное количество	5490,2±419,3	478,6±112	0,002
КОЕ-ГЕММ	1789±121,9	38±6	<0,0001
КОЕ-ГМ	1144±117,1	181±24	0,036
КОЕ-Г	988,8±101,9	114±21	0,028
КОЕ-М	875,7±136	94±18	0,141
КОЕ-Э	692,8±76,4	46±11	0,03
Соотношение клеток-предшественников			
КОЕ-ГЕММ	35,33±1,35	7,9±1,2	<0,0001
КОЕ-ГМ	19,28±0,75	37,8±4,7	<0,0001
КОЕ-Г	18,72±0,77	24,5±3,8	0,067
КОЕ-М	13,69±0,87	20,2±3,7	0,065
КОЕ-Э	12,99±0,88	10,6±2,9	0,495

Уровень спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ мобилизованной крови и ПК статистически значимо не различался, имея, однако, тенденцию к значительному снижению в Г-КСФ мобилизованной крови (табл. 6). Этот факт может быть связан с тем, что ПК перед началом тестирования проходила определенные технологические этапы сбора и транспортировки в БСК, тогда как периферическую кровь у доноров тестировали сразу после сбора, а Г-КСФ, известный как мощный антиапоптотический фактор [17-19], приводит к выбросу в циркуляцию наиболее жизнеспособных клеток. При этом уровень спонтанного апоптоза CD34+клеток, подавляющая часть которых (96,6±1,2 %) находится в G0 фазе клеточного цикла, был наиболее низким и не различался (табл. 6).

Таблица 6

**Уровень спонтанного апоптоза клеток Г-КСФ мобилизованной крови и ПК**

Параметр	ПК	Периферическая кровь после Г-КСФ	p
	n=440	n=15	
Апоптоз лейкоцитов (%)	9,18±1,19	3,4±0,6	0,387
Лимфоцитов	4,32±0,7	3,6±0,15	0,855
Моноцитов	15,35±2,02	3,8±0,72	0,309
Гранулоцитов	28,22±2,51	2,51±0,67	0,069
CD34+ клеток	2,12±0,09	2,74±0,56	0,229

При сравнении уровня Г-КСФ в периферической крови и в ПК оказалось, что в ПК уровень Г-КСФ составляет 14,8±2,2 пг/мл (n=45), что не превышает нормальный уровень сывороточного Г-КСФ в периферической крови. При клиническом использовании препаратов Г-КСФ в дозе 5–10 мкг/кг в сутки в течение 5 суток, уровень сывороточного Г-КСФ



в крови у доноров возрастает приблизительно в 1000 раз. Таким образом, уровень Г-КСФ в сыворотке ПК доношенных новорожденных не отличается от нормального уровня Г-КСФ в сыворотке здоровых доноров, что в сочетании с данными, свидетельствующими об увеличении количества лейкоцитов и CD34+клеток в ПК при наличии ряда осложнений беременности и родов, а также физиологических состояний при нормальном течении родов, удлиняющих родовой стресс, позволяет предположить изменение уровня других цитокинов и ферментов, участвующих в Г-КСФ индуцированной мобилизации лейкоцитов и CD34+клеток. При изучении уровня IL-8 в сыворотке ПК и Г-КСФ мобилизованной периферической крови было показано, что статистически значимое повышение концентрации IL-8 после применения Г-КСФ было отмечено на всех клинических моделях, независимо от степени угнетения кроветворения. При этом, концентрация IL 8 в сыворотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров до применения Г-КСФ, но меньше, чем после его отмены (табл. 7).

Таблица 7

### Концентрация IL-8 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Исследуемые группы	N	Концентрация IL 8 в сыворотке		p
		до Г-КСФ	после Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	6,07 ± 0,39	47,0 ± 6,18	0,022
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	10	108,15 ± 44,72	569,0 ± 159,0	0,013
Лечение медикаментозной цитопении	21	485,0 ± 158,0	1113,0 ± 250,0	0,040
Пуповинная кровь	45	19,83 ± 4,93		0,039*

\*- p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Концентрация ММР-9 в сыворотке крови также статистически значимо повышается в результате использования Г-КСФ во всех исследованных клинических моделях, в то время как концентрация ММР-9 в сыворотке ПК не отличалась от таковой в крови здоровых доноров до начала использования Г-КСФ (табл. 8).

Таблица 8.

### Концентрация ММР-9 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ

Исследуемые группы	N	Концентрация ММР-9 в сыворотке		p
		до Г-КСФ	после Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	225,4 ± 33,6	3333,8 ± 608,2	< 0,0001
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	5	175,0 ± 79,7	819,4 ± 254,7	0,043
Лечение медикаментозной цитопении	10	24,2 ± 7,7	826,5 ± 180,3	< 0,0001
Пуповинная кровь	45	182,4 ± 23,7		0,521*

\*- p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Такое соотношение концентрации мобилизующих цитокинов в сочетании с количеством CD34+клеток в результате мобилизации и в ПК позволяет предположить, что хотя родовой стресс и позволяет объяснить многие тенденции в изменениях клеточного состава ПК в зависимости от ряда ante- и интранатальных факторов, но, вероятно, не является единственной причиной особенностей ПК.

### Клеточный состав трансплантационного материала после процедур процессинга

В результате использования технологий, предложенных стандартом NetCord/FACT, получен трансплантационный материал, содержащий ГСК ПК. Учитывая возможность потери и перераспределения количества различных клеток в результате процессинга, концентрат ПК, готовый к криоконсервации был подробно исследован для определения количества и жизнеспособности ГСК. Результаты были сравнены с показателями трансплантационного материала, полученного при помощи стандартной сепарации (BaxterCS3000 Plus) периферической крови после проведения курса Г-КСФ у здоровых доноров. Показано, что количество лейкоцитов в продукте цитафереза значительно выше, чем в концентрате ПК (табл. 9), причем представлены они, в основном, лимфоцитами, в отличие от концентрата ПК, половину лейкоцитарного пула которого составляют гранулоциты.

Таблица 9

### Клеточный состав трансплантационного материала (×10<sup>6</sup>/мл)

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 1013	n = 15	
Лейкоциты ×10 <sup>6</sup> /мл	39,0±0,48	188,4±16,3	<0,0001
Нейтрофилы ×10 <sup>6</sup> /мл	18,3±0,27	25,8±2,91	<0,0001
Лимфоциты ×10 <sup>6</sup> /мл	13,1±0,19	119,3±11,74	<0,0001
Моноциты ×10 <sup>6</sup> /мл	5,2±0,08	37,5±4,1	<0,0001
Эозинофилы ×10 <sup>6</sup> /мл	1,1±0,02	2,86±0,53	<0,0001
Базофилы ×10 <sup>6</sup> /мл	0,2±0,02	1,12±0,17	<0,0001

Продукт цитафереза содержит значительно большее количество всех субпопуляций лимфоцитов (табл. 10).

Таблица 10

### Субпопуляции лимфоцитов в трансплантационном материале

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 62	n = 15	
Доля (%) от лимфоцитов			
CD3+	53,91±1,62	70,0±3,08	<0,0001
CD3+CD4+	38,15±1,4	46,2±2,91	0,014
CD3+CD8+	14,37±0,8	22,1±2,64	<0,0001
CD19+	16,04±0,69	16,3±2,52	0,889
CD16+CD56+	15,16±1,57	12,61±1,74	0,444
Абсолютное количество (×10 <sup>6</sup> /мл)			
CD3+	8,29±0,63	82,8±6,24	<0,0001
CD19+	2,39±0,27	19,4±2,71	<0,0001
CD3+CD4+	5,72±0,5	56,6±4,63	<0,0001
CD3+CD8+	2,26±0,23	27,4±3,01	<0,0001
CD16+CD56+	3,68±0,01	14,6±2,39	<0,0001





Доля CD34+клеток была статистически значимо выше в продукте цитафереза, тогда как доля CD133+клеток статистически значимо выше в концентрате ПК. Однако, абсолютное количество ГСК статистически значимо выше в продукте цитафереза Г-КСФ мобилизованной периферической крови (табл. 11).

Таблица 11

**Субпопуляции ГСК в трансплантационном материале**

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 47	n = 15	
Доля (%) от лимфоцитов			
CD34+ (*)	1,37±0,029	1,13±0,25	0,44
CD34+CD133+	0,44±0,05	0,08±0,029	<0,0001
CD34+CD133-	0,56±0,16	0,72±0,029	0,577
CD34+CD38-	0,74±0,08	0,86±0,09	0,43
CD34+CD71+	0,79±0,09	1,02±0,09	0,176
CD34+CD62L+	0,61±0,06	0,87±0,08	0,028
CD34+CD44+	0,9±0,08	1,14±0,017	0,165
CD34+CD117+	0,46±0,04	0,1±0,03	<0,0001
CD34+CD61+	0,42±0,05	0,72±0,16	0,02
CD34+CD38+	0,74±0,074	1,1±0,12	0,018
CD133+CD106+	0,46±0,06	0,21±0,08	0,035
CD133+CD31+	0,8±0,08	0,84±0,22	0,832
Абсолютное количество /мкл			
CD34+ (*)	810±43	1256±126	0,23
CD34+CD133+	196±24	95±28	0,03
CD34+CD61+	198±35	857±112	<0,0001
CD34+CD38+	353±56	1309±217	<0,0001
CD34+CD71+	383±71	1124±198	<0,0001
CD133+CD106+	193±26	250±44	0,28
CD133+CD31+	367±46	1001±206	<0,0001

\* - для расчетов общего количества CD34+клеток в концентрате ПК n = 1095

При этом эффективность клонирования выше в концентрате ПК, но абсолютное количество клеток предшественников всех линий гемопоэза, в том числе КОЕ-ГЕММ и КОЕ-Э, значительно выше в продукте цитафереза, тем не менее, основное количество клеток-предшественников в нем представлено гранулоцитарно-макрофагальными предшественниками, в отличие от концентрата ПК, где преобладают наиболее ранние предшественники гемопоэза (КОЕ-ГЕММ) (табл. 12). Уровень спонтанного апоптоза остается также ниже в продукте цитафереза Г-КСФ мобилизованной периферической крови в отличие от концентрата ПК, повторяя картину ПК и периферической крови до проведения соответствующих процедур процессинга (табл. 13).

Таблица 12

**Эффективность клонирования трансплантационного материала**

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	p
	n = 178	n = 15	
ЭК (105 эксплантированных мононуклеарных клеток)			
Суммарное количество	104,7±8,3	87,63±12,34	0,555
КОЕ-ГЕММ	35,24±0,6	16,4±3,1	<0,0001
КОЕ-ГМ	22,22±0,82	26,31±3,17	0,17
КОЕ-Г	17,78±0,87	21,2±2,64	0,271
КОЕ-М	12,92±0,78	16,3±2,19	0,223
КОЕ-Э	16,53±0,33	9,2±1,6	<0,0001

Продолжение табл. 12

Количество клеток-предшественников в 1 мл.			
Суммарное количество	21997±1259	94680±8826	<0,0001
КОЕ-ГЕММ	7158±426	14198±2361	<0,0001
КОЕ-ГМ	4382±228	24356±3117	<0,0001
КОЕ-Г	3626±296	19768±2726	<0,0001
КОЕ-М	2607±244	17126±2644	<0,0001
КОЕ-Э	3406±212	12232±1421	<0,0001
Соотношение клеток-предшественников.			
КОЕ-ГЕММ	33,65±1,72	18,34±1,93	0,011
КОЕ-ГМ	21,22±0,81	29,4±1,12	0,004
КОЕ-Г	16,98±0,83	23,71±1,17	0,021
КОЕ-М	12,34±0,76	18,23±0,93	0,027
КОЕ-Э	15,78±0,84	10,29±0,86	0,061

Таблица 13

**Уровень спонтанного апоптоза клеток трансплантационного материала**

Параметр	Концентрат ПК	Продукт цитафереза	P
Апоптоз лейкоцитов (%)	11,26±1,37	3,8±0,56	0,054
Лимфоцитов	4,42±0,77	3,4±0,58	0,639
Моноцитов	15,06±2,67	4,2±0,81	0,149
Гранулоцитов	29,17±2,96	2,7±0,78	0,002
CD34+ клеток	2,27±0,12	2,61±0,23	0,327

При сравнении уровня Г-КСФ в периферической крови и в ПК оказалось, что в ПК уровень Г-КСФ составляет 14,8±2,2 пг/мл (n=45), что не превышает нормальный уровень сывороточного Г-КСФ в периферической крови. При клиническом использовании препаратов Г-КСФ в дозе 5–10 мкг/кг в сутки в течение 5 суток, уровень сывороточного Г-КСФ в крови у доноров возрастает приблизительно в 1000 раз. Таким образом, уровень Г-КСФ в сыворотке ПК доношенных новорожденных не отличается от нормального уровня Г-КСФ в сыворотке здоровых доноров, что в сочетании с данными, свидетельствующими об увеличении количества лейкоцитов и CD34+клеток в ПК при наличии ряда осложнений беременности и родов, а также физиологических состояний при нормальном течении родов, удлиняющих родовой стресс, позволяет предположить изменение уровня других цитокинов и ферментов, участвующих в Г-КСФ индуцированной мобилизации лейкоцитов и CD34+клеток. При изучении уровня IL-8 в сыворотке ПК и Г-КСФ мобилизованной периферической крови было показано, что статистически значимое повышение концентрации IL-8 после применения Г-КСФ было отмечено на всех клинических моделях, независимо от степени угнетения кроветворения. При этом, концентрация IL 8 в сыворотке ПК была статистически значимо выше, чем у здоровых доноров до применения Г-КСФ, но меньше, чем после его отмены (табл. 14).

Таблица 14

**Концентрация IL-8 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ**

Исследуемые группы	N	Концентрация IL 8 в сыворотке		p
		До Г-КСФ	После Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	6,07 ± 0,39	47,0 ± 6,18	0,022
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	10	108,15 ± 44,72	569,0 ± 159,0	0,013
Лечение медикаментозной цитопении	21	485,0 ± 158,0	1113,0 ± 250,0	0,040
Пуповинная кровь	45	19,83 ± 4,93		0,039*

\* - p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.



Концентрация ММР-9 в сыворотке крови также статистически значимо повышается в результате использования Г-КСФ во всех исследованных клинических моделях, в то время как концентрация ММР-9 в сыворотке ПК не отличалась от таковой в крови здоровых доноров до начала использования Г-КСФ (табл. 15).

Таблица 15

**Концентрация ММР-9 в сыворотке ПК и крови до и после применения Г-КСФ**

Исследуемые группы	N	Концентрация ММР-9 в сыворотке		p
		До Г-КСФ	После Г-КСФ	
Здоровые доноры	6	225,4 ± 33,6	3333,8 ± 608,2	< 0,0001
Мобилизация ГСК у детей с онкогематологическими заболеваниями	5	175,0 ± 79,7	819,4 ± 254,7	0,043
Лечение медикаментозной цитопении	10	24,2 ± 7,7	826,5 ± 180,3	< 0,0001
Пуповинная кровь	45	182,4 ± 23,7		0,521*

\*- p – сравнение с уровнем здоровых доноров до применения Г-КСФ.

Таким образом, в настоящем исследовании мы показали, что сывороточные концентрации IL-8 и ММР-9 значительно повышаются в результате использования Г-КСФ, причем степень этого повышения обратно пропорциональна их первоначальной концентрации. Концентрация другой матрикс-металлопротеиназы – ММР-2, также предполагающейся на роль посредника в реализации мобилизующего действия Г-КСФ, в результате его использования не меняется. Не меняется и концентрация в сыворотке естественных ингибиторов ММР-9 и ММР-2 – TIMP-I и TIMP-II. То есть, из наших данных следует, что эффективность мобилизации, как гранулоцитов, так и ГСК зависит от степени повышения сывороточной концентрации IL-8 и ММР-9.

При исследовании спонтанного апоптоза клеток крови перед началом введения Г-КСФ оказалось, что его уро-

вень у детей при развитии медикаментозной цитопении достоверно выше, чем у пациентов при мобилизации аутологичных CD34+клеток.

Г-КСФ известен как мощный антиапоптотический фактор. В настоящем исследовании было изучено влияние Г-КСФ на уровень спонтанного апоптоза клеток крови и костного мозга. Основанием для этого является предположение о том, что потеря стволовыми клетками связи со стромальным микроокружением при выходе в циркуляцию приводит к снижению их жизнеспособности и увеличению склонности к спонтанному апоптозу. С другой стороны, возможно, увеличение количества CD34+клеток и гранулоцитов периферической крови в ответ на Г-КСФ связано с блокированием в них программы апоптоза и, как следствие, повышением продолжительности их жизни.

Было установлено, что применение Г-КСФ привело к снижению уровня спонтанного апоптоза клеток крови и костного мозга, в том числе, гранулоцитов и CD34+клеток.

Такое изменение уровня спонтанного апоптоза может быть связано как с прямым антиапоптотическим действием Г-КСФ на клетки крови и костного мозга, так и с выходом в циркуляцию большого количества клеток с меньшим уровнем апоптоза за счет мобилизующего эффекта Г-КСФ.

Итак, результаты работы демонстрируют некоторые аспекты механизма действия Г-КСФ на систему кроветворения, подтверждающиеся при всех основных вариантах клинического использования Г-КСФ: при выполнении мобилизации CD34+клеток у здоровых доноров и у пациентов в ремиссии онкогематологических заболеваний, а также при коррекции цитостатически угнетенного кроветворения. Основная роль в процессе реализации биологического действия Г-КСФ принадлежит зрелым гранулоцитам и моноцитам, имеющим рецепторы к Г-КСФ, а влияние на ГСК осуществляется путем процесса мобилизации, основными участниками которого являются провизапалительный цитокин IL-8 и матрикс-металлопротеиназа-9, финальным процессом является, по-видимому, деструкция связи ГСК со стромальными элементами костного мозга и миграция ГСК в периферический кровоток.

## ЛИТЕРАТУРА

- Baillie KE, Irvine AE, Bridges JM, McClure BG. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery // *Pediatr Res.* - 1994 Feb. - №35(2). - P.164-8.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Механизм мобилизующего действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на клетки крови у детей // *Вопросы практической педиатрии.* - 2007. - №3. - С.23-29.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Экспрессия рецепторов к Г-КСФ и IL8 на клетках крови в динамике терапии Г-КСФ // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2007. - №2. - С.61-63.
- Shimoda K, Okamura S, Harada N. et al. High-frequency granuloid colony-forming ability of G-CSF receptor possessing CD 34 antigen positive human umbilical cord blood hematopoietic progenitors // *Exp Hematology.* - 1992. - №23. - P.226-228.
- Shinjo K, Takeshita A, Ohnishi K. et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor at a various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells // *Leuk Lymphoma.* - 1997. - №25. - P.37-46.
- Райкина Е.В., Румянцев С.А. Концентрация IL-8 и матрикс-металлопротеиназ в сыворотке крови в динамике терапии Г-КСФ // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2007. - №2. - С.43-45.
- Chakrabarti S., Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils // *Journal of Leukocyte Biology.* - 2005. - №78. - P.279-288.
- Domanovic D., Wozniak G., Cernelc P. et al. Matrix metalloproteinase-9 and cell kinetics during the collection of peripheral blood stem cells by leukapheresis // *Transfusion and Apheresis Science.* - 2005. - №33. - P.37-45.
- Imamura R., Miyamoto T., Yoshimoto G. et al. Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor // *J Immunol.* - 2005. - №175. - P.2647-2654.
- Jilma B., Hergovich N., Homoncik M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD 114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans // *Br J Haematol.* - 2000. - №111. - P.314-320.
- Pruijt JF, Fibbe WE, Opendakker G. et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1999. - №96. - P.10863-10868.



12. Robinson SN, Pisarev VM, Chavez JM. et al. Use of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or FLT-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment //Stem Cells. – 2003. - №21. – P.417-427.
13. Robinson SN, Seina SM, Gohr JC. et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in the absence of matrix metalloproteinase-9 //Stem Cells and Development. – 2005. - №14. – P.317-328.
14. Thomas DB, Yoffey JM. Human fetal haemopoiesis. I. The cellular composition of fetal blood //Br.J.Haemat. - 1962. - №8. – P.290-295.
15. Watanabe T., Kawano Y., Kanamaru S. et al. Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization //Blood. – 1999. - №93(4). – P.1157-1163.
16. Roberts AW, Metcalf D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines //Blood. – 1995. - №86. – P.1600.
17. Philpott NJ., Prue RL., Marsh JC. et al. G-CSF-mobilized CD34 peripheral blood stem cells are significantly less apoptotic than unstimulated peripheral blood CD34 cells: role of G-CSF as survival factor //Br J Haematol. – 1997. - №97(1). – P.146-152.
18. Maiani NA, Mul FP, van Buul JD, Roos D, Kuijpers TW. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils //Blood. - 2002 Jan 15. - №99(2). – P.672-9.
19. Maiani NA, Roos D, Kuijpers TW. Bid truncation, bid/bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor //J Immunol. - 2004 Jun 1. - №172(11). – P.7024-30.

ПОСТУПИЛА: 18.10.2010



УДК: 616.155.392.2-036.11-06-08-053.2

**Сависько А.А.<sup>1</sup>, Шестопапов А.В.<sup>1</sup>, Теплякова Е.Д.<sup>1</sup>, Асланян К.С.<sup>2</sup>,  
Тарасова Н.Е.<sup>1</sup>, Пармон С.П.<sup>3</sup>**

## **РАЗВИТИЕ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ МИОКАРДА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ НА ЭТАПАХ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ**

<sup>1</sup>*Ростовский государственный медицинский университет, кафедра поликлинической педиатрии  
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: elenatepl@rambler.ru*

<sup>2</sup>*ГУЗ Областная детская больница г. Ростова-на-Дону  
Россия, 344015 г. Ростов-на-Дону, ул. 339 Стрелковой дивизии, 14*

<sup>3</sup>*МЛПУЗ "Консультативно-диагностический центр"  
г. Ростов-на-Дону, пр. Ворошиловский, 61*

Одним из побочных действий полихимиотерапии является развитие прогрессирующей дисфункции миокарда. Изменения показателей диастолического наполнения левого желудочка считают наиболее ранними маркерами, предшествующими развернутой клинической картине сердечной недостаточности.

Целью исследования явилось оценка диастолической функции миокарда левого желудочка и изучение состояния системы свободно-радикального окисления у детей с острыми лейкозами на этапах проведения полихимиотерапии.

Материалы и методы: обследовано 54 больных с острым лимфобластным лейкозом в возрасте от 3 до 17 лет.

Результаты: при выполнении комплексной трансторакальной доплерографической эхокардиографии обнаружено появление диастолической дисфункции уже в момент выявления заболевания, и её прогрессирование после проведённой полихимиотерапии. Развитию кардиальных осложнений сопутствовали увеличение генерации активных форм кислорода, накопление окисленных липопротеидов, что позволяет предполагать свободно-радикальную природу поражения миокарда.

Выводы: раннее выявление нарушений диастолической функции миокарда левого желудочка позволит своевременно назначать кардиотрофную терапию и снизить процент осложнений после проведения полихимиотерапии.

*Ключевые слова:* дети, острый лейкоз, кардиотоксичность, диастолическая дисфункция.

**Savisko A.A.<sup>1</sup>, Shestopalov A.V.<sup>1</sup>, Tepljakova E.D.<sup>1</sup>, Aslanyan K.S.<sup>2</sup>,  
Tarasova N.E.<sup>1</sup>, Parmon S.P.<sup>3</sup>**

## **DEVELOPMENT DIASTOLIC DYSFUNCTION MYOCARDIUM IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AT THE STAGES OF THE POLYCHEMOTHERAPY**

<sup>1</sup>*Rostov State Medical University, Department of polyclinic's pediatrics.  
29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: elenatepl@rambler.ru*

<sup>2</sup>*State Health Care Institution «Regional Children's Hospital»  
14 339 Infantry Division st., Rostov-on-Don, 344015, Russia*

<sup>3</sup>*Medical Diagnostic Center  
61 Voroshilovskiy pr., Rostov-on-Don*

The development of progressive myocardial dysfunction is one of the side effects of polychemotherapy. Changes in diastolic filling of the left ventricular is the earliest marker that precedes the full-scaled clinical picture of heart failure.

Purpose: Assessment of left ventricle's diastolic function and the study of the state of lipid peroxidation processes in children with acute leukemia at the stages of polychemotherapy.

Materials and Methods: We have examined 54 patients with acute lymphoblastic leukemia at the age ranging from 3 to 17 years old.

Results: Complex transthoracic Doppler echocardiography shows the occurrence of diastolic dysfunction at the time when the disease is diagnosed and its progression after the end of polychemotherapy. The development of cardiac complications is accompanied by an increase in the generation of reactive oxygen species, accumulation of oxydated lipoproteins, which suggests the free-radical genesis of myocardial damage.

Summary: Early detection of disorder of diastolic function of the left ventricle may allow to appoint cardiotropic therapy on the initial stage and decrease the rate of complications of polychemotherapy.

*Keywords:* children, acute leukemia, cardiotoxicity, diastolic dysfunction.



## Введение

**П**рогноз онкогематологических заболеваний детского возраста перестал быть абсолютно фатальным. Это стало возможным благодаря совместным усилиям европейских и американских ученых по внедрению интенсивных программ полихимиотерапии и сопроводительной терапии. Главной задачей является излечение пациента и повышение качества жизни при минимуме побочных эффектов, связанных с лечением. В настоящее время одной из актуальных проблем является разработка новых схем лечения и использование селективных препаратов, направленных на уменьшение токсического влияния химиотерапии, снижение количества осложнений.

Одним из побочных действий полихимиотерапии является развитие кардиопатии, приводящей к прогрессирующей дисфункции миокарда. Выделяют острую, подострую, хроническую и позднюю хроническую кардиотоксичность [1]. Острые кардиотоксические эффекты развиваются во время или непосредственно после внутривенного введения цитостатика и проявляются вазодилатацией, гипотензией и разнообразными нарушениями сердечного ритма [2]. Подострая кардиотоксичность характеризуется развитием мио- и перикардитов, возникающих на начальных этапах терапии [1]. Хронические повреждения сердца являются наиболее частыми, возникают на более поздних этапах лечения и выражаются нарушениями систолической и диастолической функций левого желудочка, дилатацией полостей сердца, различными электрографическими изменениями. Вклад в поражение сердечной мышцы, вероятно, вносит как опухолевый процесс, так и проводимая терапия.

Доказано, что при постепенном нарушении энергообразования расслабление изолированного сердца изменяется раньше, чем снижаются показатели систолической функции [3]. Именно поэтому изменения показателей диастолического наполнения ЛЖ считают наиболее ранними маркерами заболевания, предшествующими развернутой клинической картине [4]. Своевременная диагностика появляющейся минимальной дисфункции левого желудочка дает возможность своевременно начать активную терапию и предупредить появление угрожающих жизни осложнений.

В основе токсичности большинства химиопрепаратов признана индукция образования активных форм кислорода. В то же время отсутствуют сведения о взаимосвязи активации перекисного окисления липидов и развития диастолической дисфункции миокарда.

Целью настоящего исследования явилось оценка диастолической функции миокарда левого желудочка и изучение состояния системы свободно-радикального окисления у детей с острыми лейкозами на этапах проведения полихимиотерапии.

## Материалы и методы

Исследовано 54 больных (33 мальчика и 21 девочка) с острым лимфобластным лейкозом, находящихся на лечении в детском отделении клиники Ростовского государственного медицинского университета и в гемато-

логическом отделении ГУЗ Областная детская больница г. Ростова-на-Дону. Средний возраст больных составил  $8,47 \pm 0,66$  лет. Пациенты получали полихимиотерапию по протоколам ALL-MB-2002, ALL-MB-2008. Каждая клиническая группа исследовалась в установленные сроки: до начала полихимиотерапии, после индукции ремиссии и после окончания интенсивной полихимиотерапии. Группу контроля составили 32 практически здоровых детей сопоставимых по возрасту и полу основной клинической группе.

Проведено клинико-инструментальное обследование пациентов. Всем больным выполнена комплексная трансторакальная доплерографическая эхокардиография (ДэхоКГ) с использованием сканера Aspen (Siemens-Acuson), имеющего программу для проведения тканевой доплерографии. Частота инсонации во время сканирования была от 2 до 4 МГц и зависела от глубины залегания и качества визуализации структур сердца [5]. При проведении комплексной трансторакальной доплерографической эхокардиографии (ДэхоКГ) определялись все стандартные показатели, а также ряд новых эхопараметров/индексов, предложенных в последнее время для углубленного изучения систолической и диастолической функции левого желудочка. Для оценки диастолической функции миокарда левого желудочка использовали: максимальную скорость раннего пика E, максимальную скорость предсердной систолы A, соотношение пиковых скоростей трансмитрального потока E/A, индекс податливости (ATE/DT 1/2) и индекс жесткости миокарда (1/индекс податливости) [6].

Определение интенсивности спонтанной хемилюминесценции плазмы крови проводили методом, основанным на регистрации сверхслабого свечения тканей. Светосумму спонтанной хемилюминесценции регистрировали в течение 500 с, используя медицинский хемилюминометр ХЛМЦ-01 («Свет», Россия). Расчет светосуммы спонтанной хемилюминесценции осуществляли с учетом фонового свечения и выражали в условных единицах. Определение окисленных липопротеинов (ЛП) сывортки крови осуществляли по методу Yagi K. Резистентность  $\beta$ -ЛП к окислению оценивали методом Рагино Ю.И. и Душкина М.И. (1998) [7].

Статистическую обработку результатов проводили методами параметрической статистики после проверки нормального характера распределения.

## Результаты

Наши исследования показали, что традиционный подход с определением показателя трансмитрального кровотока (общепринятый оптимальный положительный критерий  $E/A < 1,0$ ) для выявления кардиальных осложнений характеризуется крайне низкой диагностической значимостью у детей с острыми лейкозами, находящихся на разных этапах полихимиотерапии и при его использовании не удалось выявить нарушение диастолической функции левого желудочка ни в одном из случаев. Тем не менее показатель E/A снижался по сравнению с группой контроля, но не достигал отрицательных величин. Поэтому нами были использованы дополнительные эхопараметры, характеризующие диастолическую функцию



миокарда левого желудочка, такие как индекс податливости миокарда и индекс жесткости миокарда. Эхокардиографическая картина диастолической функции миокарда на разных этапах полихимиотерапии не была одинакова.

При оценке диастолической функции миокарда до начала полихимиотерапии соотношение пиковых скоростей трансмитрального потока E/A снижено на 18% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Обнаружено снижение индекса податливости миокарда на 6,9% и повышение индекса жесткости миокарда на 8,3%. Хемилюминисцентный анализ показал, что до начала терапии наблюдается увеличение быстрой вспышки на 19,7% ( $p < 0,05$ ) и светосуммы на 24% ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о накоплении гидроперекисей липидов. Статистически значимых изменений в содержании окисленных липопротеидов по сравнению с контрольной группой не выявлено. Эти изменения можно расценить как начальные признаки диастолической дисфункции и окислительного стресса на фоне опухолевого процесса.

После проведения индукции ремиссии соотношение пиковых скоростей трансмитрального потока E/A составила  $1,79 \pm 0,08$ , что практически не отличалось от этого показателя у здоровых детей ( $1,78 \pm 0,07$ ). Это может объясняться коррекцией анемии путем гемотрансфузий, проведением мощной дезинтоксикационной терапии. Однако при анализе дополнительных показателей диастолической функции миокарда левого желудочка выявлено дальнейшее снижение индекса податливости миокарда на 15,9% ( $p < 0,05$ ) и рост индекса жесткости миокарда на 16,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. При анализе хемилюминисценции плазмы отмечается повышение тангенса угла альфа на 28% ( $p < 0,05$ ) и светосуммы на 10,8% на фоне снижения показателей спонтанной и индуцированной окисленности липопротеидов на 26,9% ( $p < 0,05$ ) и 28,6% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с контрольной группой. Вероятно, это связано с массивной прооксидантной нагрузкой химиотерапевтическими препаратами, приводящими к значительной активации свободно-радикального окисления, что сопровождается истощением как субстратов окисления, так и неферментативных оксидантов. Несмотря на то, что протоколы МВ для лечения острых лимфобластных лейкозов известны своей низкой кардиотоксичностью по антрациклинам, изменения диастолической функции левого желудочка

у обследованных нами пациентов свидетельствуют о начальных проявлениях кардиотоксичности.

После окончания интенсивной полихимиотерапии вновь регистрируется достоверное снижение соотношения пиковых скоростей трансмитрального потока E/A на 28,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Также отмечается достоверное уменьшение индекса податливости миокарда на 20,8% ( $p < 0,05$ ) и увеличение индекса жесткости миокарда на 27,1% ( $p < 0,05$ ). Со стороны показателей системы свободно-радикального окисления наблюдается определенный парадокс, выражающийся в увеличении спонтанного свечения на 32,7%, светосуммы на 18,9% на фоне снижения спонтанной и индуцированной окисленности липопротеидов на 28% ( $p < 0,05$ ) и на 55,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно, что, очевидно, обусловлено «вымыванием» гидроперекисей из липидной фазы липопротеиновых частиц в водную среду вследствие длительной активации перекисного окисления липидов. Это свидетельствует в пользу свободно-радикального генеза повышения ригидности миокарда в фазу диастолы, что является одним из характерных проявлений кардиоваскулярных нарушений у детей с острым лимфобластным лейкозом.

### Выводы

1. У детей с острыми лимфобластными лейкозами развивается трудновыявляемая диастолическая дисфункция миокарда, для верификации которой требуется использование дополнительных показателей (индекса податливости и индекса жесткости миокарда).
2. Диастолическая дисфункция миокарда сопровождается развитием окислительного стресса, степень выраженности которого непосредственно связана с проявлениями диастолической дисфункции миокарда, что позволяет предположить её свободно-радикальный генез.
3. Раннее выявление субклинических проявлений дисфункции миокарда сердца на фоне активации свободно-радикального окисления позволит своевременно назначить или усилить кардиотрофную терапию, а также даст основание для дальнейшего наблюдения данной группы пациентов специалистами смежных направлений, в том числе детскими кардиологами для превентивной терапии сердечных осложнений.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hartman G.N. Anthracyclines in oncology. An overview// Drugs. - 2006. - Vol. 84. - P. 1421-1427.
2. Калинкина Н.В. Патогенез антрациклиновых повреждений сердца// Журнал Академії медичних наук України. - 2005. - Т.11. - № 2. - С.238-251.
3. Баитова Г.М. Современные представления о диастолической функции сердца в норме и патологии (дисфункции) и методы ее диагностики// Весник КРСУ- 2002. - № 1. - С. 5-7.
4. Агеев Ф.Т. Эволюция представлений о диастолической функции сердца // Сердечная недостаточность. - 2000. - №1. - С.48.
5. Фейгенбаум Х. Эхокардиография.- 5-е изд. Пер. с англ. под ред. В. В. Митькова. - М: Видар, 1999. - 511 с.
6. Неласов Н.Ю., Сидоров Р.В., Мохаммад Мусса. Современные подходы к оценке глобальной и регионально систолической функции миокарда левого желудочка с помощью доплерэхокардиографических показателей у больных ишемической болезнью сердца// Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. - 2008.-N 2.-С.39-41
7. Рагино Ю.Н., Душкин М.И. Резистентность к окислению гепариносажженных  $\beta$ -липопротеидов сыворотки крови при ишемической болезни сердца// Клин. лаб. диагностика. - 1998. - № 11. - С. 3-5.



Бгане Н.М., Трембач А.В.

## ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО VII АКТИВИРОВАННОГО ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ КОАГУЛОПАТИЯХ У ДЕТЕЙ С СЕПСИСОМ

*Кубанский государственный медицинский университет,  
кафедра анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии ФПК и ППС  
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина 4. E-mail: nal-bgane@yandex. ru*

Цель: изучить эффективность рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови в комплексной интенсивной терапии резистентных коагулопатий при сепсисе у детей.

Материалы и методы: в анестезиолого-реанимационном отделении ДККБ проведено исследование 38 детей (n=38) с тяжелым сепсисом в возрасте от 2 мес. до 17 лет, которым при терапии резистентных коагулопатий использовался рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови.

Результаты: у детей I группы до года удалось купировать клинические и лабораторные признаки коагулопатии только после двукратного, каждые 2 часа внутривенного введения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови. В отличие от детей I группы, детям II группы старше года оказалось достаточным однократного введения препарата. Отсутствие эффекта при использовании рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови отмечалось у детей I и II группы с коагулопатией потребления в сочетании с прогрессирующим синдромом полиорганной недостаточности.

Выводы: рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови эффективен при интенсивной терапии приобретенных коагулопатий при тяжелом сепсисе, резистентных к традиционной гемостазкорректирующей терапии.

*Ключевые слова:* коагулопатия, рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови, тромбоэластография, АЧТВ, ПТВ.

Bgane N., Trembach A.

## APPLICATION OF RECOMBINANT VII ACTIVATED COAGULATION FACTOR FOR CHILDREN WITH RESISTANT COAGULOPATHY CAUSED SEPSIS

*Kuban State Medical University  
Department of Anaesthesiology, Critical Care Medicine and Transfusiology of Professional and Training  
Development Department  
4 Sedina st., Krasnodar, 350063, Russia. E-mail: nal-bgane@yandex. ru*

Purpose: To investigate the effectiveness of recombinant VII activated coagulation factor in complex therapy of children with resistant coagulopathy caused by sepsis.

Materials and Methods: 38 children from 2 months to 17 years old were investigated with resistant coagulopathy caused by sepsis and using of recombinant VII activated coagulation factor. Patients were divided into 2 groups. The first group concluded the children before 1 year old; the second group concluded the children after 1 year old.

Results: The children of first group revealed the improvement of clinical and laboratory status after two intravenous applications (2 hours between using) of recombinant VII activated coagulation factor. The single use of recombinant VII activated coagulation factor was sufficient for children of second group. There was no effect in both groups of children with sepsis and multiorgan failure.

Summary: The application of recombinant VII activated coagulation factor is effective for therapy of children with resistant coagulopathy caused by severe sepsis.

*Keywords:* Coagulopathy, recombinant VII activated coagulation factor, thromboelastography, APTT, PTT.



## Введение

В последнее время при проведении интенсивной терапии приобретенных коагулопатий у детей, важное место занимает рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови (rFVIIa). Он инициирует гемостаз в месте повреждения сосудов, формируя комплексы с тканевым фактором, обеспечивая максимальную активацию тромбоцитов и этот процесс осуществляется независимо от присутствия VIII или IX факторов свертывания, приводит к усилению синтеза тромбина и формированию стабильного фибринового сгустка [1]. Изначально рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови был разработан и применялся для лечения кровотечений и проведения хирургических операций у пациентов с наследственной или приобретенной гемофилией и высоким титром ингибитора к факторам свертывания VIII или IX, но в настоящее время показания к его применению значительно расширились и он является эффективным при интенсивной терапии других приобретенных коагулопатий [2], в т.ч. коагулопатии при сепсисе у детей.

Цель исследования: изучить эффективность рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови в комплексной интенсивной терапии резистентных коагулопатий при сепсисе у детей.

## Материалы и методы

В анестезиолого-реанимационном отделении Детской краевой клинической больницы с 2006 года было проведено исследование 38 детям (n=38) с тяжелым сепсисом в возрасте от 2 мес. до 17 лет, которым при терапии резистентных коагулопатий использовался рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови. Учитывая возрастные особенности гемокоагуляции [3], исследованные дети были разделены на 2 группы: I группа – 17 детей (n=17) с тяжелым сепсисом в возрасте от 2 мес. до 1 года, II группа – 21 ребенок (n=21) с тяжелым сепсисом в возрасте от 1 года до 17 лет. Оценка тяжести состояния у детей проводилась по педиатрической оценочной шкале PELOD Score (таб.1).

Таблица 1

### Характеристика исследованных пациентов

	I группа	II группа
Возраст	2 мес.-1 год	9 (1-17) лет
Количество	17	21
PELOD (баллы)	30 (25-35)	27 (20-35)

При диагностике исходных коагулопатий использовали:

- алгоритм дифференциальной диагностики приобретенных коагулопатий [4];
- рекомендации Международного общества по тромбозам и гемостазу по диагностике и интенсивной терапии ДВС синдрома – 2009.

У всех детей I и II группы перед введением рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови использовался алгоритм, включающий в себя:

- протекцию компенсаторных механизмов системы гемостаза и или протезирование дефицитов системы гемостаза – СЗП – 10 мл/кг каждые 6 часов, уровень Ht 30%, тромбоцитов – от  $50 \times 10^9/\text{л}$  и выше;

- коррекция гомеостаза – pH-7,2 и выше;
- согревание –  $t^0$  тела выше  $36^{\circ}\text{C}$ , в связи со снижением эффективности рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови в условиях гипотермии [5].

При применении рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови применялись следующие показания и дозировки [6]:

- отсутствие эффекта от стандартной комбинированной гемостатической терапии (СЗП- резистентная терапия), с применением хирургических методов остановки кровотечения;
- доза рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови 60-130 мкг/кг в/в болюсно, каждые 2 часа, в кратности необходимой для купирования кровотечения;
- средняя терапевтическая дозировка 90 мкг/кг.

При проведении гемостазиологического мониторинга в первую очередь регистрируются активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и протромбиновое время (ПТВ), а также особое внимание уделяется параметрам тромбоэластографии, т. к. рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови влияет не только на скорость формирования тромба, но и на физические свойства сгустка крови, которые не могут быть обнаружены путем обычных тестов коагуляции [7, 8].

Среди остальных маркеров гемостаза также регистрировались: количество тромбоцитов, уровень фибриногена, уровень растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), содержание антитромбина III (АТ III), уровень продуктов деградации фибрина (ПДФ), уровень D-димера.

## Результаты исследования и их обсуждение

Рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови применялся детям I и II группы, у которых были как клинические проявления в виде кровотечений и геморрагического отделяемого из дренажей, из желудочно-кишечного тракта, из легких, со слизистых оболочек рта, носа, макрогематурии, так и следующие исходные коагулопатии: у 88% детей (n=15) I группы имело место коагулопатия потребления и у 12% (n=2) детей - печеночная коагулопатия, а у детей II группы в 95 % (n=20) случаев выявлена коагулопатия потребления, а в 5 % (n=1) - печеночная коагулопатия. Эффективность при использовании рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови оценивалась по данным клинических проявлений коагулопатий – регресс и купирование в динамике кровотечения или геморрагического отделяемого и по лабораторным критериям.

У 11 детей (65%) I группы удалось купировать клинические и лабораторные признаки коагулопатии только после двукратного, каждые 2 часа, внутривенного введения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови, 3 детям (18%) I группы оказалось достаточным однократного введения данного препарата, а 1 ребенку (6%) было проведено трехкратное введение для получения положительного клинического результата. При изучении динамики маркеров гемостаза в I группе через 1 час и через сутки после применения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови отмечается снижение АЧТВ, ПТВ, по данным тромбоэластографии укорочение параметров R и K, увеличение





амплитуды МА, увеличение константы эластичности и коагуляционного индекса. У 2 детей (11%) I группы с коагулопатией потребления эффекта от применения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови не наблюдалось.

В отличие от детей I группы, 17 детям (80%) II группы оказалось достаточным однократного введения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови для получения положительного клинического результата, а 2 детям (10%) потребовалось двукратное, каждые 2 часа, введения препарата. При изучении динамики маркеров гемостаза во II группе, так же как и в I группе, через 1 час и через сутки после применения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови отмечалось снижение АЧТВ, ПТВ, по данным тромбоэластографии укорочение параметров R и K, увеличение амплитуды МА, увеличение константы эластичности и коагуляционного индекса у 2 детей (10%) II группы с коагулопатией потребления эффекта от применения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови не наблюдалось.

Всем детям I и II группы после терапии рекомбинантным VII активированным фактором свертывания крови с положительным эффектом была продолжена терапия свежемороженой плазмой в дозе 10 мл/кг каждые 12 часов.

Рецидивов коагулопатий и тромбоэмболических осложнений у детей I и II группы после применения рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови не отмечалось.

При анализе причин отсутствия эффективности от использования рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови у 2 детей из I группы и у 2 детей II группы, всего у 4 детей (11%), выявилось наличие у этих детей коагулопатии потребления в сочетании с прогрессирующим синдромом полиорганной недостаточности. Тяжесть состояния по шкале PELOD у этих пациентов составила 35 баллов, что соответствует прогнозируемому летальному исходу в 90 % случаев, в последствие у этих же детей отмечался летальный исход. Данные исследования анализа причин отсутствия эффекта перекликаются с литературными данными [9].

### Выводы

1. Рекомбинантный VII активированный фактор свертывания крови эффективен при интенсивной терапии приобретенных коагулопатий при тяжелом сепсисе, резистентных к традиционной гемостазкорректирующей терапии.
2. Для эффективности рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови, необходимо двух-трехкратное введение детям I группы, в отличие от детей II группы (различия связаны с возрастными особенностями гемокоагуляции у детей I группы).
3. Отсутствие эффекта при использовании рекомбинантного VII активированного фактора свертывания крови отмечается у 11% детей I и II группы с коагулопатией потребления в сочетании с прогрессирующим синдромом полиорганной недостаточности.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hedner U. Erhardt E. Potential role of recombinant factor VIIa as a hemostatic agent// Clinical advances in hematology & oncology. – 2003. - Feb; 1 (2). – P.112-119
2. Veldman A. Hoffman M. Ehrenforth S. New insights into the coagulation system and implications for new therapeutic options with recombinant factor VIIa// Current medical chemistry. – 2003. - May; 10 (10). – P.797-811
3. Кобец Т.В., Бассалыго Г.А. Курс лекций по детской гематологии. – Симферополь, 2000.-77с.
4. Заболотских И.Б., Синьков С.В., Шапошников С.А. Диагностика и коррекция расстройств системы гемостаза. – М.: Практическая медицина, 2008.–331с.
5. Kheirabadi BS et al. In vitro effect of activated recombinant factor VII (rFVIIa) on coagulation properties of human blood at hypothermic temperatures// The Journal of Trauma. – 2007. - Nov; 63(5). – P.1079-1086
6. Kirpalani H. Lennox H. Huang. Manual of pediatric intensive care. - PMPH-USA, 2009.-977p.
7. Hendriks HG et al. Effects of recombinant activated factor VII on coagulation measured by thromboelastography in liver transplantation// Blood coagulation fibrinolysis an journal in haemostasis and trombosis. – 2002. - Jun; 13(4). – P.309-313
8. Sorensen B. Ingerslev J. Thromboelastography and recombinant factor VIIa-hemophilia and beyond// Seminars in hematology. – 2004. - Jan; 41(1Suppl). – P.140-144
9. Alten JA et al. Pediatric off-label use of recombinant factor VIIa// Pediatrics. – 2009. - Mar; 123(3). – P.1066-1072

ПОСТУПИЛА: 08.10.2010



УДК: 616.36-002-084:616.15-006-053.2

Опалева Н.В.<sup>1</sup>, Полевиченко Е.В.<sup>2</sup>, Асланян К.С.<sup>1</sup>, Зотова В.В.<sup>3</sup>, Ефремова Е.Ф.<sup>3</sup>,  
Орешкина Л.Д.<sup>1</sup>, Хаспекян А.Х.<sup>1</sup>, Яценко И.В.<sup>1</sup>, Васильева Е.В.<sup>1</sup>, Гончарова Л.В.<sup>1</sup>,  
Краснянская Н.В.<sup>1</sup>, Голованова Н.А.<sup>1</sup>, Мариина Н.В.<sup>4</sup>, Огинская Н.Г.<sup>4</sup>,  
Курузян Т.Г.<sup>4</sup>, Еркина Г.В.<sup>4</sup>, Калинина Т.Н.<sup>4</sup>, Шайхутдинова А.М.<sup>4</sup>

## АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ В ДИНАМИКЕ ПРОГРАММНОЙ ТЕРАПИИ

ГУЗ «Областная детская больница»:

<sup>1</sup>отделение гематологии, <sup>3</sup>иммунологическая лаборатория,

<sup>4</sup>клинико-диагностическая лаборатория,

Россия, 344085, г. Ростов-на-Дону, ул. 334-й Стрелковой дивизии, 14,

E-mail: dogcrosst@aaanet.ru; nat-opaleva@yandex.ru; тел. 224-24-86.

<sup>2</sup>Ростовский государственный медицинский университет, кафедра детских болезней № 1,  
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, тел. 250-42-06

Цель: создание алгоритма проведения вакцинопрофилактики вирусного гепатита В у детей с острым лимфобластным лейкозом.

Материалы и методы: изучены данные 181 ребенка с острым лимфобластным лейкозом, из которых 99 пациента получили специфическую профилактику вирусного гепатита В вакциной «Энджерикс-В». Дана оценка корреляционных связей между эффективностью проводимой вакцинопрофилактики и степенью лейко/нейтропении пациентов в дни вакцинаций. Проведен анализ уровня инфицированности гепатитом В на этапах вакцинации.

Результаты: предложен алгоритм проведения вакцинопрофилактики вирусного гепатита В у детей с острым лимфобластным лейкозом.

Ключевые слова: дети, острый лимфобластный лейкоз, вирусный гепатит В, специфическая профилактика, эффективность.

Opaleva N.V.<sup>1</sup>, Polevichenko E.V.<sup>2</sup>, Aslanyan K.S.<sup>1</sup>, Zotova V.V.<sup>3</sup>, Efremova E.F.<sup>3</sup>,  
Oreshkina L.D.<sup>1</sup>, Haspekyan A.H.<sup>1</sup>, Yachenko I.V.<sup>1</sup>, Vasilieva E.V.<sup>1</sup>, Goncharova L.V.<sup>1</sup>,  
Krasnyanskaya N.V.<sup>1</sup>, Golovanova N.A.<sup>4</sup>, Mariina N.V.<sup>4</sup>, Oginskaya N.G.<sup>4</sup>, Kuruzyan T.G.<sup>4</sup>,  
Erkina G.V.<sup>4</sup>, Kalinina T.N.<sup>4</sup>, Shaihutdinova A.M.<sup>4</sup>

## ALGORITHM OF HEPATITIS B VACCINAL PREVENTION AT CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN DYNAMICS OF PROGRAM THERAPY

State Health Care Institution «Regional Children's Hospital»:

<sup>1</sup>Haematology Department, <sup>3</sup>Immunologic Laboratory, <sup>4</sup>Clinicodiagnostic Laboratory

14 339 Strelkovoy Divisyi st., Rostov-on-Don, 344085, Russia.

E-mail: dogcrosst@aaanet.ru; nat-opaleva@yandex.ru; tel. 224-24-86.

<sup>2</sup>Rostov State Medical University, Department of Children Diseases № 1  
29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia.

Purpose: To create the algorithm of hepatitis B vaccinal prevention at children with acute lymphoblastic leukemia.

Materials and Methods: The data of 181 children with acute lymphoblastic leukemia, from which 99 patients received specific hepatitis B prevention with vaccine «Engerix B», have been investigated. The authors have assessed correlations between efficiency of offered vaccinal prevention and leuco/neutropenia degrees at patients in days of vaccinations. The analysis of hepatitis B infect level at stages of vaccination was carried out.

Results: The algorithm of hepatitis B vaccinal prevention at children with acute lymphoblastic leukemia is offered.

Keywords: Children, acute lymphoblastic leukemia, hepatitis B, specific prevention, efficiency.



## Введение

Вакцинопрофилактика вирусного гепатита В (ВП ВГВ) является приоритетным методом предотвращения данной инфекции у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). В настоящее время целый ряд авторов представляет сведения о достаточно высокой эффективности ВП ВГВ у данного контингента детей [1; 2; 3]. Однако, несмотря на многократные упоминания о фоновой миелодепрессии как негативном факторе вакцинопрофилактики, сочетающейся с полихимиотерапией (ПХТ), в доступной нам отечественной и зарубежной литературе мы не обнаружили каких-либо данных о взаимосвязи степени гемодепрессии пациента на этапах вакцинации с результатами ВП ВГВ. Кроме того, не существует единых рекомендаций по проведению контроля за инфицированностью ВГВ пациентов на этапах вакцинации.

Цель настоящего исследования – создание алгоритма проведения ВП ВГВ у ранее не вакцинированных детей с ОЛЛ на фоне программной ПХТ.

## Материалы и методы

Под наблюдением находились 181 ребенок с ОЛЛ в возрасте от 1 до 15 лет. Из исследования исключались пациенты, ранее вакцинированные против ВГВ или имеющие положительные маркеры ВГВ при поступлении в стационар. Основную группу составили 99 детей, получившие профилактические прививки против ВГВ на фоне лечения ОЛЛ, контрольную – 82 ребенка, не получавшие их. Все дети получали программную терапию по протоколу ALL-BFM-90m.. Основная и контрольная группы были сопоставимы по половому и возрастному составу.

Вакцинация проводилась рекомбинантной дрожжевой вакциной “Энджерикс-В” производства “Smith Kline Beecham”, Великобритания, по схеме 0-1-2-6-12 месяцев удвоенными дозами (20 мкг HBsAg детям до 10 лет, 40 мкг HBsAg детям старше 10 лет), начиная с 1-2 дня поступления в стационар. Введения вакцины в сроки 0-1-2-6-12 месяцев обозначались соответственно как вакцинации V1, V2, V3, V4, V5. Необходимо подчеркнуть, что до поступления в гематологический стационар никто из пациентов основной и контрольной групп не получал ВП ВГВ, все дети при поступлении имели отрицательные маркеры ВГВ.

Оценка эффективности ВП ВГВ основывалась на результатах серологического исследования крови на маркеры ВГВ (HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe, anti-HBcorAg IgG, anti-HBcorAg IgM) у всех детей и определением показателей anti-HBs у вакцинированных иммуноферментным методом на приборе Elisa-Processor II фирмы “Behring” с тест-системами производства НПО “Вектор-Бест” (Новосибирск). У вакцинированных детей серологическое исследование крови на маркеры ВГВ проводилось при поступлении (до начала ВП и лечения), на 6-м месяце в процессе ВП и лечения и через 15-16 месяцев от момента поступления (т. е. спустя 3-4 месяца после завершения курса ВП ВГВ), у невакцинированных детей – в аналогичные сроки. Показатели anti-HBs определялись у получивших ВП пациентов перед каждой вакцинацией и через 3-4 месяца после завершения всего курса ВП. Определение HBV-DNA методом ПЦР наборами реагентов «Полигеп-В» фирмы «Литех», г. Москва выполнялось при поступлении до начала вакцинации и через 3-4 месяца после ее завершения. Эффективность вакцинации оценива-

лась с помощью двух критериев: 1) конечная иммуногенная эффективность (КИЭ) вакцинации и 2) защитная эффективность (ЗЭ) вакцинации. ИЭ определялась по среднему показателю концентрации anti-HBsAg (в мМЕ/мл) в группе вакцинированных через 3-4 месяца после завершения курса вакцинации. ЗЭ в группе определялась как процент вакцинированных лиц, у которых предотвращено путем вакцинации наличие в крови антигенов вируса гепатита В (HBsAg и/или HBeAg) и оценивалась через 3-4 месяца после полного завершения вакцинации.

Учитывая, что лейко- и нейтропения являются наиболее частыми, длительными и тяжелыми осложнениями программного лечения ОЛЛ у детей [4; 5], нашей целью было выявление возможных различий в характере корреляционных связей между результатами ВП ВГВ и степенью лейко- и нейтропении у пациентов. Для этого из числа вакцинированных детей с ОЛЛ рассмотрена группа детей, получивших полный график вакцинации (n=83). Гемограмма изучалась в дни проведения каждой из пяти вакцинаций.

Рассматривались индивидуальная иммуногенная эффективность (ИИЭ) вакцинации, определяемая по показателю концентрации anti-HBsAg (в мМЕ/мл) у каждого ребенка через 3-4 месяца после завершения вакцинации и индивидуальная защитная эффективность (ИЗЭ), определяемая в аналогичные сроки как факт предотвращения у каждого ребенка инфекции ВГВ. Оценивалась корреляция между ИИЭ вакцинации каждого ребенка и показателями лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ), гранулоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в дни вакцинаций в подгруппах детей с различными степенями лейкопении и гранулоцитопении (О, I, II, III, IV) согласно критериям NCIC [6]. Оценивалась корреляция между ИЗЭ как фактом предотвращения инфекции ВГВ у каждого ребенка и показателями лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ), гранулоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в дни вакцинаций в подгруппах детей с различными степенями лейкопении и гранулоцитопении.

Статистическая обработка материалов проводилась на персональном компьютере Intel Pentium III с использованием пакета “Статистика” (Stat Soft Statistika version 6.0, Inc. (2003)). Достоверность различий для параметрических признаков оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента, для непараметрических признаков – с использованием точного критерия Фишера. Оценка корреляционных связей проводилась методом Спирмена с оценкой коэффициента корреляции r. Оценка достоверности проводилась по уровню  $p < 0,05$ . Результаты исследований представлены в международной системе единиц СИ.

## Результаты

Рассмотрены показатели иммуногенной эффективности вакцинации у детей с ОЛЛ на этапах вакцинации. Первая вакцинация проводилась в период разгара основного заболевания, характеризовавшегося периферическим бластозом, лейкопенией или лейкоцитозом, нейтропенией/агранулоцитозом, относительным или абсолютным лимфоцитозом. Вторая и третья вакцинации проводились на фоне интенсивной полихимиотерапии и, соответственно, на фоне иммуносупрессии и угнетения гемопоэза.

Средние показатели концентрации anti-HBsAg были низкими в эти сроки и составили  $11,4 \pm 2,5$  мМЕ/мл после V1,  $3,9 \pm 1,2$  мМЕ/мл после V2,  $4,5 \pm 1,4$  мМЕ/мл после V3. Вакцинация 4 также проводилась на этапе интенсивной полихимиотерапии, средний показатель концентрации anti-HBsAg после V4 увеличился до  $13,3 \pm 2,6$  мМЕ/мл, что



можно объяснить бустерным эффектом вакцинации 4. Самый высокий средний показатель концентрации anti-HBsAg -  $35,1 \pm 5,8$  мМЕ/мл отмечается после проведения вакцинации 5, соответствующей этапу поддерживающей терапии. Таким образом, конечная иммуногенная эффективность вакцинации была невысокой и составила  $35,1 \pm 5,8$  мМЕ/мл.

Также проведена оценка динамики уровней сероконверсии и серопротекции. При анализе уровня сероконверсии установлено, что после первой вакцинации всего у 99 (51,6%) детей с ОЛЛ определялись антитела к HBsAg. После второй и третьей вакцинаций, проводимых на фоне интенсивной ПХТ, доля детей, имевших anti-HBs, уменьшалась и составила соответственно 32,6% (62 ребенка) и 26,5% (50 детей). После проведения четвертой и пятой вакцинаций доля пациентов с сероконверсией увеличивалась и составила соответственно 47,9% (79 детей) и 60,0% (94 ребенка). При анализе уровня серопротекции было выявлено, что показатели anti-HBs > 10 мМЕ/мл имели после V1 всего 70 (36,5%) детей, после проведения V2 и V3 количество детей с протективным уровнем anti-HBs уменьшалось и составило 47 (24,7%) и 37 (19,6%). После проведения последующих вакцинаций (V4 и V5) количество детей с протективным уровнем anti-HBs увеличивалось и составило 75 человек (45,5%) и 91 (58,0%). Таким образом, динамика средних показателей концентрации anti-HBsAg соответствовала динамике уровней сероконверсии и серопротекции, самые низкие показатели зарегистрированы на этапах V2 и V3.

При оценке ЗЭ вакцинации у детей с ОЛЛ выявлено, что в сроки 15-16 месяцев от момента поступления в стационар и начала лечения (что соответствовало срокам 3-4 месяца после завершения курса вакцинации у вакцинированных детей), серонегативными на HBsAg и/или HBeAg и отрицательными на HBV-DNA методом ПЦР были 61 (73,5%) вакцинированных против ВГВ детей. Серонегативными на HBsAg и/или HBeAg и отрицательными на HBV-DNA методом ПЦР в эти же сроки были 46 (56,1%) детей контрольной группы ( $p=0,047$ ). Таким образом, за-

щитная (профилактическая) эффективность вакцинации была высокой (73,5%).

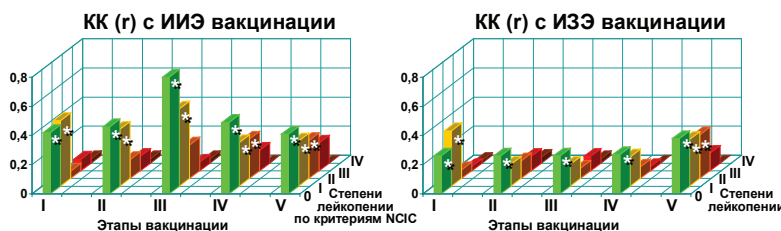
Необходимо отметить, что полный объем вакцинации (пять введений удвоенной дозы вакцины «Энджерикс-В») был выполнен у 83 детей (83,8%) из 99, начавших вакцинопрофилактику ВГВ. По различным причинам не получили полный объем вакцинации 16 детей (16,2%). Сроки вынужденного прерывания ВП ВГВ и дальнейшего исключения пациентов из активной иммунизации ВГВ были различными. Так после первой вакцинации из числа вакцинированных были исключены 2 ребенка, умерших от осложнений основного заболевания. После V2 один ребенок умер от прогрессирования основного заболевания. Три вакцинации получили 96 детей. После V3 из числа вакцинируемых вышло наибольшее количество детей – 10. Из них 7 – в связи с летальным исходом от прогрессирования и осложнений основного заболевания. Три ребенка не получили четвертую вакцинацию в связи с выявлением у них HBsAg. Четыре вакцинации получили 86 детей, после чего 3 из них далее не прививались: один ребенок умер от прогрессирования и осложнений основного заболевания. Два ребенка не получили пятую вакцинацию в связи с выявлением у них HBsAg.

Следовательно, у 11 пациентов (11,1%) вакцинация была прервана в связи с летальным исходом основного заболевания, а у 5 пациентов (5,1%) – в связи с выявлением у них ВГВ на фоне его вакцинопрофилактики.

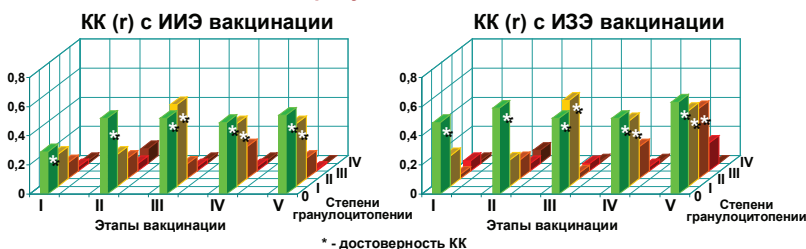
При дальнейшем клинико-лабораторном обследовании этих 5 детей у 3 из них был диагностирован острый вирусный гепатит В с исходом в хронический вирусный гепатит В (ХВГВ), а у 2 – первично-хронический ВГВ, что было обусловлено низкой выработкой anti-HBs у них в концентрации < 10 МЕ/мл. Таким образом, эти дети заболели ВГВ, несмотря на проводимую вакцинацию против ВГВ, на фоне недостаточного иммунного ответа на иммунизацию.

Проведен корреляционный анализ между результатами ВП ВГВ у детей с ОЛЛ, получивших полный график вакцинации ( $n=83$ ) и степенью их гемодепрессии (О, I, II, III, IV степенями лейкопении и гранулоцитопении) согласно критериям NCIC (рис. 1).

**Корреляционные взаимосвязи между показателями лейкоцитов и эффективностью ВП ВГВ в подгруппах детей с различными степенями лейкопении**



**Корреляционные взаимосвязи между показателями гранулоцитов и эффективностью ВП ВГВ в подгруппах детей с различными степенями гранулоцитопении**



\* - достоверность КК

**Рисунок 1. Корреляционные взаимосвязи между показателями лейкоцитов и гранулоцитов и эффективностью ВП ВГВ в подгруппах детей с различными степенями лейко- и гранулоцитопении**



Как следует из представленных данных, дети с минимальными степенями лейко- и гранулоцитопении (0 - на всех этапах вакцинации, I – на их большинстве), имеют более высокие и достоверные коэффициенты корреляции с эффективностью вакцинального процесса, чем дети с более глубокими степенями (III и IV) лейко- и гранулоцитопении. Наряду с этим, от V1 к V5 резко снижается количество больных, вакцинируемых при IV степени гранулоцитопении: 48,2%-26,5%-13,3%-9,6%-0%, а достоверные умеренные корреляции между I степенью гранулоцитопении и эффективностью вакцинации появляются при малом количестве детей с агранулоцитозом, т. е. на этапах V3-V5. Это может свидетельствовать о важной роли отсутствия агранулоцитоза для достижения более высокой эффективности вакцинации.

**Выводы**

Таким образом, резюмируя представленные данные, можно сделать следующие выводы:

1) Вакцинопрофилактика вирусного гепатита В у ранее не привитых против ВГВ детей с ОГЗ, проводимая по схеме 0-1-2-6-12 месяцев удвоенными дозами с первых дней ПХТ, обладает относительно низкой иммуногенной (уровень серопротекции – 58,0%, среднегеометрические показатели anti-HBs – 35,1 мМЕ/мл), но высокой защит-

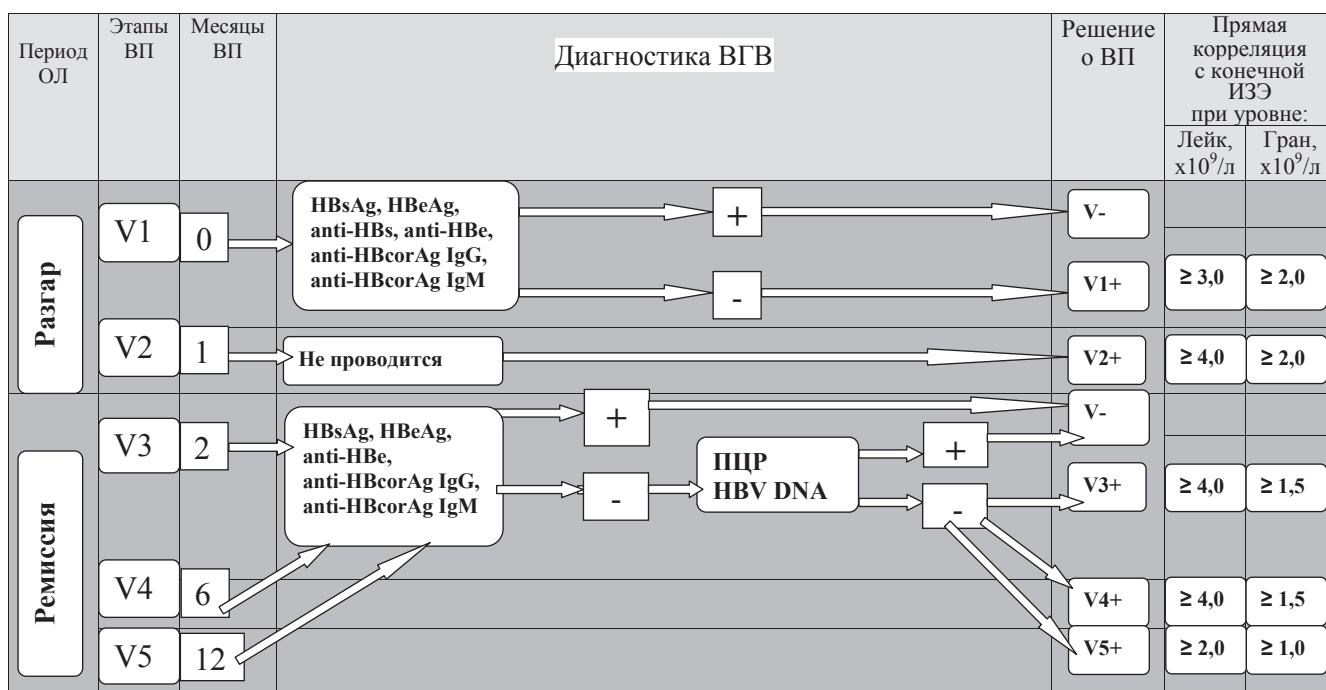
ной эффективностью (73,5%), достоверно превышающей процент не инфицированных ВГВ не привитых детей с ОЛЛ (56,1 %).

2) Необходимо проведение серологического и ПЦР контроля ВГВ на этапах вакцинации у детей с ОЛЛ с целью своевременного исключения инфицированных ВГВ, несмотря на проводимую вакцинопрофилактику, детей.

3) Показатели лейкоцитов и гранулоцитов в подгруппах ранее не привитых против ВГВ детей с ОЛЛ вне лейкопении и гранулоцитопении (0 степень по шкале NCIC) достоверно, прямо и умеренно коррелируют с конечными ИИЭ и ИЗЭ вакцинального процесса на всех этапах ВП ВГВ.

На основании полученных результатов разработан алгоритм проведения вакцинопрофилактики ВГВ у ранее не привитых детей с ОЛЛ на фоне программной ПХТ (рис. 2).

Данный алгоритм позволяет оптимизировать результаты вакцинопрофилактики вирусного гепатита В, так как в зависимости от показателей лейкоцитов и гранулоцитов в день вакцинации дает возможность оценить ее последующую защитную эффективность. Помимо этого, алгоритм позволяет своевременно исключить из вакцинального процесса пациентов с острым лимфобластным лейкозом, инфицированных вирусом гепатита В на фоне вакцинопрофилактики ВГВ.



**Рисунок 2. Алгоритм проведения вакцинопрофилактики ВГВ у ранее не вакцинированных детей с ОЛЛ на фоне программной ПХТ**

Примечание: «+» - положительный результат теста (хотя бы один из указанных маркеров положителен);  
 «-» - отрицательный результат теста (все указанные маркеры отрицательные),  
 «V-» - вся последующая вакцинопрофилактика отменяется;  
 «V<sub>n</sub>+» - вакцинация с соответствующим порядковым номером выполняется.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Качанов Д.Ю., Шаманская Т.В., Абдуллаев Р.Т. и др. Вакцинация детей с онкологическими заболеваниями //Онкогематология. – 2009. - №1. – С. 57-64.
2. Желудкова О.Г., Русанова М.Г., Пастушенко В.В. и др. Специфическая профилактика гепатита В у детей с острым лимфобластным лейкозом //Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2003. – Т. 2, №2. – С. 92 – 95.
3. Предеина Н.С. Иммунопрофилактика гепатита В у детей со злокачественными новообразованиями на фоне полихимиотерапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук – М., 2004. – 24 с.
4. Moryl-Bujakowska A., Czogala M., Czogala W., Balwierz W. The assessment of efficacy of hepatitis B prophylaxis in children with acute lymphoblastic leukemia //Przegl Lek. – 2004. – Vol. 61, Suppl. 2.– P. 85 – 88.
5. Сафина А.И., Зарипов М.М., Гайнуллина Э.А. Анализ анамнестических данных и осложнений при проведении программного лечения детей с ОЛЛ по протоколу ВФМ //Гематология и трансфузиология. – 1999. – Т. 44, №6. – С. 31.
6. Иванова Л.Ф., Дмитриева Н.В. Частота инфекционных осложнений у детей с острыми лейкозами на фоне программной терапии //Контроль инфекций, сопроводительная терапия и профилактика у иммунокомпрометированных пациентов: сб. тр. Всерос. науч.-практ. конф. – М., 2005. – С. 40.
7. Переводчикова Н.И. (ред.) Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Переводчиковой. – 2-е изд., доп. – М.: Практ. мед., 2005. – С. 661-693.

ПОСТУПИЛА: 08.10.2010

Росторгуев Э.Е.<sup>1</sup>, Григоров С.В.<sup>2</sup>

## МОДЕЛЬ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ

*<sup>1</sup>ГУЗ Областная детская больница**344015, г. Ростов-на-Дону, ул. 339 Стрелковой дивизии, 14. E-mail: ed.rost@mail.ru**<sup>2</sup>ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»**Минздравсоцразвития России**Россия, 344033, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия 63*

В настоящее время доступность методов нейровизуализации не решила проблему раннего выявления опухолей головного мозга у детей.

Материалы и методы: проведено сравнительное исследование у 57 пациентов с опухолями головного мозга в возрасте до 18 лет. Методом дискриминантного анализа выделены факторы риска, построена модель индивидуального риска по развитию опухоли ЦНС в детском возрасте.

*Ключевые слова:* опухоли мозга, дети, ранняя диагностика, малые аномалии развития, антенатальные факторы риска.

Rostorguev E.E.<sup>1</sup>, Grigorov S.V.<sup>2</sup>

## PATTERN OF CHILDREN'S TUMORS EARLY DETECTION

*Regional Children's Hospital**14 339 Infantry Division st., Rostov-on-Don, 344015, Russia. E-mail: ed.rost@mail.ru**<sup>2</sup>Federal State Institution "Rostov Cancer Research Institute"**Ministry of Health and Social Development of Russia,**63, 14 Line, Rostov-on-Don, 344037, Russia.*

In our days the availability of neurovisualization methods don't solve the problems of the early diagnostics of brain tumors in childhood. The comparative study was carried out in 57 patients aged to 18 years with brain tumors. By the discriminant analysis method the risk factors were defined, the model of the individual risk of brain tumor development in childhood was constructed.

*Keywords:* brain tumors, children, early diagnostic, small developmental abnormality, antenatal risk factors.

### Введение

У детей опухоли головного мозга (ОГМ) занимают первое место по частоте среди солидных злокачественных опухолей и стоят на 2 месте среди причин смертности от всех опухолей детского возраста. Первый пик заболеваемости, приходящийся на двух - семилетний возраст, определяет трудности клинической диагностики новообразований головного мозга у этой категории больных [1,5,8,10,11].

В настоящее время доступность методов нейровизуализации (РКТ, МРТ, НСГ) не решила проблему раннего выявления опухолей головного мозга в детском возрасте. Объем первично диагностированной опухоли не имеет тенденции к уменьшению, что сохраняет актуальность поиска анамнестических и клинических маркеров бластоматозного процесса ЦНС в стадии компенсации, еще без четких клинических проявлений заболевания [7,9].

### Материалы и методы

В работе осуществлен анализ результатов клинико-анамнестического исследования, проведенного у 57 паци-

ентов с опухолями головного мозга в возрасте до 18 лет. С целью сравнения полученных результатов обследована сопоставимая по полу и возрасту группа детей с острой травмой ЦНС в количестве 76 человек. Нами разработан протокол антенатального этапа развития пациента, согласно которому оценивался 21 параметр течения беременности у матери. Выявляемые при клиническом осмотре пациента малые аномалии развития (МАР) классифицировали согласно международному протоколу четко распознаваемых врожденных морфогенетических вариантов развития [12,13].

Достоверность различий средних величин независимых выборок оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента и непараметрических критериев Вилкоксона и Манна-Уитни в зависимости от типа распределения показателей. Для выяснения значимости различных факторов, способствующих развитию опухолей головного мозга, был проведен статистический анализ с применением двухвходовых таблиц сопряженности и расчетом критерия независимости  $\chi^2$  Пирсона. Исходя из неоднозначности характера процессов, влияющих на развитие опухоли, была разработана модель с использованием метода дисперсионного анализа. Наряду с этим



был использован вероятностно-статистический подход, строящийся на теореме Байеса и ее приложениях. При статистической обработке был использован пакет программ Statistic 6.0.

### Результаты и их обсуждение

Определено, что в основной группе количество малых аномалий развития соответствовало  $7,94 \pm 0,32$ , а в контрольной  $0,89 \pm 0,22$  ( $p < 0,001$ ). По данным литературы, пороговым значением считается наличие 5-7 МАР, выше которого следует предполагать нарушения онтогенеза ЦНС, косвенно свидетельствует о высокой вероятности больших ВПР, скрытых хромосомных синдромов или служит маркером еще не проявившегося заболевания [2,3,4,6].

Из 77 четко распознаваемых врожденных морфогенетических вариантов развития (МАР) выделены 22, имеющие достоверное отличие от контрольной группы. С достоверностью  $p < 0,001$  в группе с ОГМ встретились следующие МАР: высокое готическое небо, гетерохромия радужки, асимметрия ушных раковин (по размеру, форме, расположению), приращение мочек ушей, оттопыренные уши, трихомегалия, упрощенная форма ушей.

С достоверностью  $p < 0,01$  в группе с ОГМ встречались МАР: складчатый язык, асимметрия разреза глаз, дисплазия тазобедренных суставов, сандалевидная щель, пятна «кофе с молоком», невусы.

С достоверностью  $p < 0,05$  в группе с ОГМ встречались следующие МАР: гипотрихоз, низкий рост волос на шее, низкий рост волос на лбу, короткая шея, широкое пупочное кольцо, гемангиомы кожи, витилиго, утолщение ногтевых фаланг и ротированные назад уши.

Таким образом наиболее значимые различия были выявлены для МАР в области лица, глаз, ушной раковины, кожи и ее придатков.

Проведенный анализ антенатального этапа развития пациентов выявил 9 факторов, встретившихся в группе пациентов с ОГМ. С достоверностью  $p < 0,001$  отмечалось повышение температуры тела выше  $38^{\circ}\text{C}$  в 1-й половине беременности. С достоверностью  $p < 0,01$  встречались такие антенатальные риски, как контакты матери или отца с вредностями до беременности, контакты матери с профессиональными вредностями во время беременности. С достоверностью  $p < 0,05$  в группе с ОГМ встречались антенатальные риски в виде отсутствия планирования данной беременности, не желанность ребенка, поздний срок установления беременности, токсикоз 1-й половины беременности, токсикоз 2-й половины беременности и угроза прерывания беременности в первой и второй половине.

Параллельно были рассчитаны значения критерия независимости Пирсона ( $\chi^2$ ), отражающего зависимость между встречаемостью МАР, патологией антенатального этапа развития и наличием опухоли головного мозга. С целью стратификации предикторов развития опухолей головного мозга у детей поведет анализ их в совокупности друг с другом и построена модель риска возникновения ОГМ на основе исследованных нами признаков.

Методом дискриминантного анализа рассчитана функция F1 вида:

$F1 = A + a1 \cdot X1 + \dots + a24 \cdot X24$ , где A – свободный член уравнения равный 3,9,  $a1$ - $a24$  – коэффициенты при соответствующих значениях показателей  $X_i$ . При этом наличие признака в модели ранжируется как 1, а его отсутствие – 0. Стандартизованные коэффициенты  $a_i$  для каждой переменной дискриминантной функции могут быть интерпретированы следующим образом: чем больше стандартизованный коэффициент по модулю, тем больше вклад соответствующей переменной в дискриминацию совокупностей. Данные о факторной структуре канонических функций используются для оценки коэффициентов весомости рассматриваемых признаков при решении прогностической задачи (табл.1, 2 и рис.1).

Таблица 1

Значения коэффициентов дискриминантной функции F1 ( $a_i$ ) для прогнозирования развития опухолей головного мозга у детей

Показатели			Коэффициенты $a_i$ для дискриминантной функции F1
1	2	3	
Малые аномалии развития и данные антенатального развития плода	X 1	Гетерохромия радужки	0,589
	X 2	Приращение мочки ушей	0,459
	X 3	Трихомегалия	0,387
	X 4	Высокое небо	0,282
	X 5	Асимметрия ушей (по размеру, форме, расположению)	0,270
	X 6	Повышение температуры тела выше $38^{\circ}\text{C}$ в первой половине беременности	0,265
	X 7	Плоская переносица	0,153
	X 8	Встречаемость ротированных назад ушей	0,141
	X 9	Гипотрихоз	0,124
	X 10	Контакты отца с проф. вредностями до беременности	0,117
	X 11	Пятна «кофе с молоком»	0,106
	X 12	Невусы	0,094
Постоянный член уравнения (A)			3,9





Таблица 2

Значения коэффициентов дискриминантной функции F1 (ai) для прогнозирования развития опухолей головного мозга у детей

Показатели			Коэффициенты ai для дискриминантной функции F1
1	2	3	4
Малые аномалии развития и данные антенатального развития плода	X 13	Асимметрия размеров глаз	0,092
	X 14	Контакты матери с проф. вредностями до беременности	0,091
	X 15	Дисплазия тазобедренных суставов	0,082
	X 16	Выступающий лоб	0,081
	X 17	Открытые ноздри носа	0,081
	X 18	Токсикоз 1-й половины беременности	0,078
	X 19	Сандалевидная щель.	0,070
	X 20	Гемангиомы	0,070
	X21	Искривление носовой перегородки	0,068
	X22	Токсикоз 2-й половины беременности	0,062
	X 23	Низкий рост волос на лбу	0,059
	X 24	Контакты матери с проф. вредностями во время беременности	0,058
Постоянный член уравнения (A)			3,9

Для прогнозирования развития опухолей головного мозга у детей нами установлены пороговые значения коэффициентов дискриминантной функции F1. Так, при F1 более 7,1 риск возникновения опухоли головного мозга высокий (вероятность 0,61-1,0). При  $5,1 < F1 < 7,0$  ожидается умеренный прогноз развития опухоли головного мозга (вероятность 0,3-0,5). При  $F1 < 5,0$  прогноз возникновения опухоли головного мозга низкий (вероятность 0-0,2).

Как видно из рис. 1, индивидуальные значения функций F1 контрольной группы и группы пациентов с опухолями головного мозга (при наличии факторов высокого и среднего риска) отчетливо группируются в трех неперекрывающихся совокупностях точек, что и соответствует различному риску возникновения опухолевого процесса.

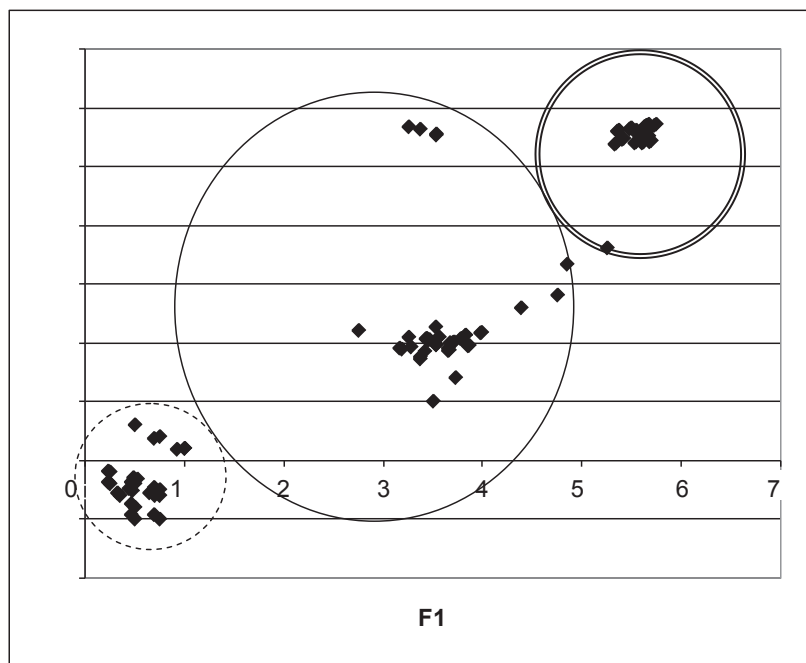


Рис. 1. Распределение индивидуальных значений дискриминантной функции (F1) по риску возникновения опухоли головного мозга у детей. Пунктирной линией обозначены дети контрольной группы, сплошной линией – дети со средним риском развития опухоли, двойной сплошной – дети с высоким риском развития опухоли.



### Выводы

У больных с опухолями срединных структур головного мозга достоверно чаще встречается диагностически значимый уровень малых аномалий развития, в областях черепа и лица, глаз, ушной раковины, кожи и ее придатков. Патология антенатального этапа развития является одним из факторов развития опухолей головного мозга у детей.

Для прогнозирования развития опухоли головного мозга у конкретного ребенка возможно использование расчета дискриминантной функции. Ее значение более 5,1 соответствует умеренному, а более 7,1 - высокому риску возникновения опухоли головного мозга. При появлении любой очаговой, общемозговой или неясной соматической симптоматики, этот пациент требует на ранних этапах применения информативных неинвазивных методов исследования (МРТ, РКТ).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов А.В. Оптимизация диагностики новообразований центральной нервной системы: Автореферат дис...канд. мед. наук. - Уфа, 2000. - 24 с.
2. Барашнев Ю.И. Перинатальная неврология. - Триада-Х, 2001. - 487 с.
3. Барашнев Ю.И., Бахарев В.А., Новиков П.В. Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей. Путеводитель по клинической генетике. - Триада-Х, 2004. - 560 с..
4. Барашнев Ю.И., Розанов А.В., Петрова Л.А. и др. Врожденные пороки развития головного мозга, выявляемые у плодов и новорожденных //Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2005. - Том 50, № 6. - С 9-12.
5. Детская онкология: Руководство для врачей // Авт.: Б.Ф. Афанасьев, И.А. Балдуева, М.Б. Белогрудова и др. - СПб.: Спецлит, 2002.- 351 с.
6. Кириллова Е.Я., Никифорова О.К., Жученко Н.А., Побединский Н.М., Красников Д.Г. Мониторинг врожденных пороков развития у новорожденных //Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2000.- № 1. - С.18-21.
7. Медяник И.А., Фраерман А.П., Хоменюк В.А. К вопросу о причинах поздней диагностики опухолей головного мозга //Всероссийская научно-практическая конференция Поленовские чтения. - СПб. Петербург. - 2005. - С.230-231.
8. Опухоли и опухолеподобные процессы у детей: классификация, морфология, гистогенез, молекулярная биология /Авт.: Е. Д. Черствой, Г. И. Кравцова, А. В. Фурманчук и др. Под ред. Е. Д. Черствого и др. - Минск.: ООО «Асар», 2002. - 400с.
9. Орлов Ю.А., Шаверский А.В. Особенности клиники и лечения опухолей головного мозга у детей в возрасте до 3 лет // Первая Всероссийская Конференция по детской нейрохирургии. - Москва, 2003. - С. 43.
10. Петрович С.В., Конопя Н.Е., Сачивко Н.В. Опухоли ЦНС в республике Беларусь: заболеваемость и выживаемость на популяционном уровне //Вопросы онкологии. - 2002.- Том 48, №3. - С.306-310.
11. Ременник Л.В., Петрова Г.В., Старинский В.В. Дескриптивная эпидемиология злокачественных новообразований у детей в России //Росс. онкол. журн. - 1998. - № 2. - С.39-47.
12. Pinsky L. Minor congenital anomalies: Organization: recommendations and prefatory comments on individual submissions by Workshop members. Prevention physical and mental congenital defects. Part C: Basic a medical science, education and future strategies. -Alan. Liss. Inc., 1985. - P. 39-41.
13. Smith D. W. Monitoring Birth defects and Enrolment. - New York, 1971. - P. 169-175.

ПОСТУПИЛА: 12.10.2010



Пухтинская М.Г., Эстрин В.В.

## **ПРОФИЛАКТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ РЕКОМБИНАНТНЫМ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ**

*ФГУ Ростовский НИИ акушерства и педиатрии Росздрава  
Россия, 344013, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43. E-mail: m.lelik@rniiar.ru*

Целью исследования стало определение иммунологических критериев назначения чр-ГКСФ доношенным новорожденным с РДС второго типа, находящимся на ИВЛ.

Материалы и методы: у 64 новорожденных при поступлении определяли: уровень Г-КСФ, ФРФ, sFas, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-1, ФНО (ИФА); субпопуляционный состав лимфоцитов; апоптоз (проточная цитометрия, окрашивание аннексином и пропидием йодида; Beckman Coulter Epics, США).

Выводы: критериями для назначения чр-ГКСФ является снижение эндогенного Г-КСФ ниже 1556 пкг/мл и увеличение лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе свыше 9,5% и 0,56% (соответственно). Необходимо проведение рандомизированных исследований использования чр-ГКСФ до развития нейтропении.

*Ключевые слова:* нейтропения, сепсис, новорожденный, цитокины, апоптоз.

Puchtinskaya M.G., Estrin V.V.

## **PREVENTIVE MAINTENANCE OF BACTERIAL COMPLICATIONS AT NEWBORNS WITH THE RESPIRATORY DISTRESS-SYNDROME BY HUMAN RECOMBINANT GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR**

*Rostov Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics  
43 Mechnikova st., Rostov-on-Don, 344013, Russia. E-mail: m.lelik@rniiar.ru*

Purpose: Definition of immunological criteria of purpose of rhGCSF became research aim newborns with respiratory distress syndrome, being on PPV.

Materials and Methods: At 64 newborns determined at receipt: G-CSF, FRF, sFas, IL-6, IL-8, IL-4, IL-1, TNF (IFA), subpopulational structure of lymphocytes and level of lymphocytes in early and late apoptosis (flow cytometry with colouring annexin and propidium iodide; Beckman Coulter Epics, USA).

Summary: Criteria for prescription of rhGCSF are decrease of plasma level of endogenous hr-GCSF low 1556 pg/ml and increase of lymphocytes, being in early and late apoptosis, above 9,5% and 0,56% (accordingly). Realization of randomized studies use rh-GCSF at newborns to development of neutropenic is necessary.

*Keywords:* neutropenia, sepsis, newborn, cytokin, apoptosis.



## Введение

Высокий уровень бактериальных осложнений у доношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом (РДС), находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), определяет необходимость совершенствования существующих методов профилактики сепсиса [4-5].

В этой связи возможность коррекции нейтропении у новорожденных с РДС на ИВЛ человеческим рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (чр-ГКСФ), о которой впервые сообщил E.R. Gillan с соавторами в 1994 году, представляла большой научный и практический интерес [6]. В исследовании положительный терапевтический эффект (снижение числа заболевших сепсисом) был достигнут благодаря способности чр-ГКСФ повышать уровень зрелых активных нейтрофилов в периферической крови.

Затем в научной литературе появился целый ряд подобных работ. Анализ результатов опубликованных рандомизированных исследований доказал безопасность использования чр-ГКСФ у новорожденных с РДС, однако в некоторых из них эффективность использования чр-ГКСФ не подтверждалась [7-13].

Следует подчеркнуть, что во всех проводимых исследованиях критерием для назначения чр-ГКСФ новорожденным служило снижение количества нейтрофилов в периферической крови пациента менее 1500 кл/мм<sup>3</sup> [7-13].

Перечисленные выше факты позволили предположить, что развитие абсолютной нейтропении является следствием истощения костно-мозговых резервов и возможностей иммунной системы новорожденного ребенка с тяжелой респираторной патологией. Поэтому назначение чр-ГКСФ с целью увеличения количества зрелых активных нейтрофилов могло оказаться неэффективным. Кроме того, время ожидания развития нейтропении такого уровня оставалось безвозвратно потерянным для лечащего врача и пациента.

Поэтому, в соответствии с рекомендациями CONSORT (2001), с одобрения локального этического комитета и письменного согласия родителей каждого пациента, нами было проведено контролируемое рандомизированное слепое клиническое испытание, в котором критерием для назначения чр-ГКСФ новорожденным с РДС на ИВЛ служило снижение в гемограмме общего количества лейкоцитов менее  $6 \times 10^9$ /л. Полученные результаты подтвердили эффективность и безопасность использования чр-ГКСФ у новорожденных без выраженной нейтропении (снижение заболеваемости сепсисом в 5,5 раз, летальности в 6 раз и финансовых затрат в 1,3 раза) [14].

Таким образом, необходимость поиска иных лабораторных критериев назначения чр-ГКСФ новорожденным с РДС на ИВЛ, позволяющих обеспечить его наибольшую клиническую эффективность, стала очевидной.

Целью настоящего исследования стало определение иммунологических критериев назначения чр-ГКСФ, основанное на изучении иммунопатогенеза развития нейтропении у новорожденных с РДС, находящихся на ИВЛ.

## Материалы и методы

В исследование, одобренное локальным этическим комитетом и письменными согласиями родителей пациентов, вошли 64 новорожденных с РДС, поступивших в

реанимационное отделение в тяжелом состоянии на ИВЛ, родившихся в сроке гестации  $39 \pm 2,1$  недель, с массой тела  $3700 \pm 565$  грамм, от матерей в возрасте  $26 \pm 7,4$  лет с отягощенным акушерским анамнезом, с оценкой по Апгар  $3,2 \pm 1,6$  балла.

Тяжесть состояния пациентов была обусловлена дыхательной недостаточностью (гипоксемия  $pO_2 < 50$ , гиперкапния  $pCO_2 > 45$ , выраженный ацидоз - pH капиллярной крови  $< 7,25$ ). Все дети были переведены на ИВЛ в родильном зале и транспортированы в отделение реанимации в первые часы жизни ( $3 \pm 0,9$ ).

При поступлении, помимо стандартного обследования, пациентам проводилось определение:

- субпопуляционного уровня интерлейкинов ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-1; фактора некроза опухоли (ФНО), эндогенного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ), фактора роста фибробластов (ФРФ), sFas методом иммуноферментного анализа (ИФА) на многофункциональном программируемом счетчике для иммунологических исследований с программным обеспечением (Victor, Финляндия), используя тест-системы фирмы Cytimmune sciences inc. (США) и Bender MedSystems GmbH (Австрия, Вена);

- субпопуляционного состава лимфоцитов крови методом однопараметрического иммунофенотипирования, используя реагенты фирмы Immunotech Beckman Coulter (США): флуоресцентно-меченные CD 3, CD 4, CD 8, CD 14, CD 19, CD 34, CD 56, CD 69, CD 71, CD 95, HLA-DR моноклональные антитела;

- процентного количества лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе, используя антитела к аннексину и прокрашивание пропидием йодида, с учетом результатов на проточном цитометре Beckman Coulter Epics XL (США), используя стандартные протоколы. Пул лейкоцитов крови выделяли лизирующим раствором OptiLyse C Beckman Coulter (США) по прилагаемому протоколу.

Ретроспективно все пациенты были разделены на 2 группы. У 30 детей (I группа) на 3-4 сутки пребывания в отделении в гемограмме наблюдалось снижение абсолютного числа нейтрофилов ( $M < 2000$  кл/мм<sup>3</sup>). У 34 пациентов (II группа) количество нейтрофилов в периферической крови не снижалось.

Результаты исследования оценивались методом вариационной статистики с использованием выборочного среднего, стандартного отклонения, средней квадратичной ошибки, доверительных интервалов, медианы и ошибки медианы. Достоверность различия отдельных выборок определялась с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Абсолютный и относительный риск развития неонатального сепсиса и летального исхода оценивались методом четырехпольных таблиц. Достоверность полученных результатов оценена критерием Гехана-Вилкоксона. Достоверность предположений подтверждена посредством использования точного теста Фишера-Ирвина при 5% уровне значимости в отношении двухсторонней альтернативы. Статистическая мощность исследования составила 80% ( $\alpha \leq 0,05$ ). В исследовании общие статистические показатели определялись с использованием Excel-2000; для оценки достоверного различия выборок и вида распределения эмпирических данных применялся пакет прикладных программ «МегаСтат». Для оценки долей по методу Фишера-Ирвина и расчета мощности исследования использовался пакет Statistica-6.



**Результаты и обсуждение.**

Из 30 детей с нейтропенией (I группа) неонатальный сепсис был диагностирован на 5-6 сутки пребывания в отделении у 26 пациентов. Летальный исход заболевания в этой группе зарегистрирован у 11 новорожденных; из них 8 погибло от неонатального сепсиса. Представленные показатели статистически значимо превышали аналогичные во II группе ( $p < 0,05$ ), где из 34 пациентов только у 5 человек РДС осложнился развитием сепсиса. Летальный исход во II группе отмечен у 6 новорожденных, из них от септической инфекции умер 1 ребенок.

В нашем исследовании основанием для постановки клинического диагноза «сепсис» служило сочетание не менее двух симптомов системной воспалительной реакции организма (СВРО) с наличием любого гнойно-воспалительного очага, или с положительной гемокультурой, или с наличием клинических симптомов инфекции [15].

У всех пациентов с неонатальным сепсисом в случае летального исхода клинический диагноз был подтвержден патологоанатомическим вскрытием.

У пациентов с нейтропенией (I группа) при поступлении в отделение регистрировался статистически значимо более низкий уровень эндогенного Г-КСФ, ФРФ и sFas по сравнению с новорожденными без нейтропении (II группа). Кроме того, у пациентов первой группы определялось статистически значимое увеличение уровня стволовых клеток (CD34) и лимфоцитов, готовых к апоптозу (CD95) и находящихся в раннем и позднем апоптозе (таблица 1).

Остальные иммунологические показатели у пациентов обеих групп статистически значимо не отличались.

Таблица 1

**Иммунологические показатели крови, статистически значимо отличающиеся при поступлении у пациентов с развившейся в последующем нейтропенией и без нее**

Показатель	I группа (медиана) (n=30)	II группа (медиана) (n=34)	P
CD34%	0,3	0,1	0,017794
Г-КСФ пк/мл	995	1600	0,000000
sFAS пк/мл	5927,1	7319,7	0,004788
ФРФ пк/мл	20,0	34,9	0,029117
CD95%	9,2	1,9	0,000482
Апоптоз ранний %	13,5	12,3	0,036122
Апоптоз поздний %	1,99	0,3	0,006958

Для каждого из представленных критериев была построена характеристическая ROC-кривая с определением числового значения («точки cutoff»), позволяющего диагностировать развитие нейтропении с высокой чувствительностью, специфичностью и точностью. В таблице представлены данные расчета диагностической значимости изучаемых тестов (таблица 2).

Таблица 2

**Диагностическая значимость иммунологических критериев, прогнозирующих развитие нейтропении у новорожденных с РДС на ИВЛ**

Показатель/ Cutoff	Чувствительность %	Специфичность %	Точность %	ПЦП	ПЦО	ПЦТ %
Г-КСФ/1556 пкг/мл	85,1	75,6	79,6	71,8	87,5	84
sFAS/5870 пкг/мл	69,5	74,4	71,9	74,4	60,4	80
ФРФ/25,7 пкг/мл	68	82	74,4	82	61	85
CD95/ 5,1%	75	68	86,2	79	65	78,5
Апоптоз поздний/ 0,56%	94,1	98	85,3	89,1	94,1	86,5
Апоптоз ранний/ 9,59%	82	93	74	87	72	74

Полученные результаты подтвердили, что у пациентов с нейтропенией неонатальный сепсис осложнял течение основного заболевания в 5 раз чаще, чем у детей без нейтропении. Кроме того, летальный исход заболевания в этой группе отмечался в 8 раз чаще.

Статистически значимое повышение процентного содержания плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки (CD34) в периферической крови подтверждало достаточность костномозговых резервов у пациентов I группы. Однако стволовые клетки не реализовывались в зрелые нейтрофилы. Возможно, по причине недостаточно высокого уровня эндогенного Г-КСФ, являющегося физиологическим колониеобразующим регулятором нейтрофилов [9, 10]. Не случайно в нашем исследовании уро-

вень эндогенного Г-КСФ у пациентов I группы был почти в 2 раза ниже, чем у новорожденных II группы.

Полученные результаты подтвердили, что у детей с развившейся в последующем нейтропенией уже при поступлении в отделение (то есть на самых ранних этапах заболевания) превалировали процессы альтерации иммунокомпетентных клеток над процессами пролиферации. Так плазменный уровень антиапоптогенного и пролиферативного факторов (sFAS и ФРФ), участвующих в регуляции процесса естественной гибели клеток [12 - 15], был статистически значимо ниже у пациентов этой группы по сравнению с новорожденными II группы. На этом фоне вполне закономерным было определение у пациентов I группы высокого процента лимфоцитов, находящихся в



раннем и позднем апоптозе. Что, в свою очередь, согласно законам «обратной связи», вызывало компенсаторное повышение относительного содержания CD34 в периферической крови, обнаруженное нами у пациентов I группы.

#### Выводы:

1. Развитие нейтропении у новорожденных с респираторной патологией обусловлено дефицитом эндогенного Г-КСФ и активацией процессов апоптоза иммунокомпетентных клеток.
2. Новорожденные с РДС на ИВЛ на ранних этапах развития нейтропении обладают достаточным костномозговым резервом.
3. Снижение эндогенного Г-КСФ и усиление апоптоза лимфоцитов крови с высокой точностью, чувствительностью и специфичностью прогнозирует развитие

нейтропении уже при поступлении пациента в отделение реанимации.

4. Необходимость использования чр-ГКСФ в интенсивной терапии подтверждена происходящими иммунопатогенетическими процессами в организме новорожденного с РДС, находящегося на ИВЛ.
5. Назначать чр-ГКСФ новорожденным с РДС на ИВЛ следует при снижении плазменного уровня эндогенного Г-КСФ ниже 1556 пкг/мл и увеличении в периферической крови относительного содержания лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе, свыше 9,5% и 0,56% (соответственно).
6. Необходимо проведение рандомизированных исследований по эффективности и безопасности использования чр-ГКСФ у новорожденных с РДС на ИВЛ до развития нейтропении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов А.Г., Володин Н.Н., Гребенников В.А. и др. Принципы ведения новорожденных с респираторным дистресс-синдромом: Метод. рекомендации. - М.: Б. и., 2002. - С. 14-18.
2. Белушкина Н.Н., Хасан Хамад Али, Северин С.Е. Молекулярные основы апоптоза // Вопросы биол. мед. и фарм. Химии. - 1998. - №4. - С.15-23.
3. Бочоришвили В. Г. Новая иммунологическая концепция сепсиса и ее клиническое значение // Междунар. журн. иммуно-реабилитации. - 1997. - № 6. - С. 42-31.
4. Галактионов В. Г. Иммунология. - М.: Изд-во МГУ, 1998. - 479 с.
5. Дементьева Г. М. Пульмонологические проблемы в неонатологии // Пульмонология. - 2002. - № 12. - С.6-12.
6. Gillan E.R., Christensen R.D., Yu Suen et al. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia // Blood. - 1994. - Vol. 84. - P. 1427-1433.
7. Bronchud M. H., Potter M.R., Morgenstern G. et al. In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients // Br. J. Cancer. - 1988. - Vol. 58. - P. 64-69.
8. Cairo M.S., Christensen R., Sender L.S. et al. Results of a phase I/II trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in very low birthweight neonates: significant induction of circulatory neutrophils, monocytes, platelets, and bone marrow neutrophils // Blood. - 1995. - Vol. 86. - P. 2509-2515.
9. Chang Z.S., Zeng L.B., Chang C.S., Qing W.W. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis // World J. Gastroenterol. - 2003. - V. 9. - P. 1521-1524.
10. Gessler P., Luders R., Konig S. et al. Neonatal neutropenia in low birthweight premature infants // Am. J. Perinatol. - 1995. - Vol.12. - P. 34-38.
11. Gillan E.R., Christensen R.D., Yu Suen et al. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia // Blood. - 1994. - Vol. 84. - P. 1427-1433.
12. Manroea B.L., Weinberg A.G., Rosenfeld C.R., Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells // J. Pediatr. - 1979. - Vol. 95. - P. 89-98.
13. Schibler K., Osborne K., Leung L. et al. A randomized, placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor administration to newborn infants with neutropenia and clinical signs of early-onset sepsis // Pediatrics. - 1998. - Vol. 102. - P. 6-13.
14. Эстрин В.В., Ефанова Е.А., Пухтинская М.Г. Профилактика и терапия бактериальных осложнений рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у новорожденных в критических состояниях. - Ростов-на-Дону: Изд. Феникс, 2007. - С. 64-91.
15. Исаков Ю. Ф., Белобородова Н. В. Сепсис у детей. - М.: Изд. Мокеев, 2001. - С. 44-45.

ПОСТУПИЛА: 19.10.2010



Ледяев М.Я.<sup>1</sup>, Степанова О.В.<sup>1</sup>, Шахова Н.В.<sup>2</sup>,  
Мерзлякова Н.А.<sup>1</sup>, Скопенко Е.Б.<sup>1</sup>

## КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОФИЛИИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

<sup>1</sup>ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет»,  
кафедра детских болезней

400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1. E-mail: myledyaev@gmail.com

<sup>2</sup>МУЗ «Детская клиническая больница № 8»

400001, Волгоград, ул.Ковровская, 2

Актуальность: современные подходы к терапии гемофилии отражаются на клинических симптомах заболевания.

Цель: клиническая характеристика гемофилии у детей в условиях применения факторов свертывания.

Материалы и методы: проведен ретроспективный анализ 145 историй болезни детей с гемофилией с оценкой частоты встречаемости основных симптомов в зависимости от применяемых методов лечения. Дано описание клинических проявлений ингибиторной формы гемофилии.

Результаты: продемонстрирована эффективность заместительной терапии концентратами факторов свертывания, о чем свидетельствует уменьшение частоты встречаемости спонтанных кровотечений, постгеморрагической анемии, отсутствие в клинике контрактур суставов.

*Ключевые слова:* гемофилия, дети

Ledyayev M.Y.<sup>1</sup>, Stepanova O.V.<sup>1</sup>, Shahova N.V.<sup>2</sup>, Merzlyakova N.A.<sup>1</sup>, Scopenok E.B.<sup>1</sup>

## CLINICAL CHARACTERISTICS OF HEMOPHILIA TODAY

<sup>1</sup>Volgograd State Medical University

Department of Children's Diseases

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russia. E-mail: myledyaev@gmail.com

<sup>2</sup>Volgograd, Kovrovskaya st., 2 Children's Hospital №8

Urgency: The main clinical symptoms of hemophilia are depended on methods therapy.

Purpose: Hemophilia clinical characteristics observed in children who was received therapy by concentrates of coagulability factors.

Materials and Methods: Analysis of 145 history cases children with hemophilia and evaluation of the basic symptom occurrence depending on methods applied was carried out. The inhibitory forms of hemophilia clinical manifestations was described.

Results: Substitute therapy efficacy by concentrates of coagulability factors was demonstrated. The latter testifies the reduction of spontaneous hemorrhage, post-hemorrhage anemia and absence of articular contraction in the clinics.

*Keywords:* Hemophilia, children



## Введение

Гемофилии – группа наследственных заболеваний, обусловленных генетически детерминированным дефектом синтеза антигемофильных плазменных факторов свертывания. Частота гемофилии А, по данным ВОЗ, колеблется от 5 до 10, гемофилии В – от 0,5-1 до 5 случаев на 100 тысяч новорожденных мальчиков [1,2].

В течение последнего десятилетия значительно изменились подходы к заместительной терапии при гемофилии у детей [3].

С 2003 года на базе детской клинической больницы №8 г. Волгограда лечение больных гемофилией проводится только с использованием концентратов факторов свертывания, а с 2008 года все дети вошли в программу дополнительного лекарственного обеспечения, что позволило соответствовать общепринятой схеме терапии. Как известно, она включает три этапа обеспечения гемостаза [4]:

- профилактический, целью которого является поддержание активности фактора свертывания (VIII или IX) на уровне 5% от нормы, предупреждая кровоизлияния в суставы;
- лечение на дому, когда концентраты факторов вводятся сразу после травмы или при малейших признаках кровоизлияния;
- лечение по факту кровотечения, при этом дозы факторов VIII/IX рассчитываются в зависимости от клинических проявлений.

Цель исследования: выявление клинических особенностей гемофилии у детей в условиях современной заместительной терапии.

## Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ 145 историй болезни 28 больных гемофилией, находившихся на стационарном лечении в городской детской больнице № 8 г. Волгограда с 1987 г. по 2009 г. Больные были разделены на 2 группы в зависимости от проводимой терапии: первая группа – больные, получавшие криопреципитат, – 16 человек (57%) или 47 историй (32,4%), и вторая группа – больные, получавшие концентраты VIII или IX факторов, – 12 больных (43%) или 98 историй (67,6%). Нами был разработан бланк для анализа клинико-диагностических проявлений гемофилии и ее осложнений при различных методах терапии.

## Результаты и обсуждение

Анализ анамнестических данных показал, что первые диагнозы гемофилии были выставлены в возрасте до года 20 больным (71,4%), что свидетельствует о ранних клинических проявлениях и соответствует тяжелой или средне-тяжелой форме заболевания. В возрасте с 1 года до 3 лет гемофилия была установлена у 4 больных (14,3%), с 3 до 5 лет у 2 больных (7,2%), с 9 до 10 лет – у 2 больных (7,2%). Наиболее длительное пребывание больных в стационаре за одну госпитализацию отмечалось в первой группе – 19,3 дня (от 1 до 86), тогда как средняя продолжительность лечения больных во второй группе составила 13,7 дня (от 3 до 33), что является экономически более выгодным, увеличивает оборот койки, а также снижает нетрудоспособность родителей и отлученность пациентов от общества,

школы и обучения, оказывая меньшее травмирующее воздействие на жизнь детей.

Сравнительный анализ клинических проявлений гемофилии при различных способах лечения выявил, что в первой группе гемартрозы составили 41,3%, кровотечения и кровоизлияния – 30,4%, гематомы – 28,3%, тогда как во второй группе гемартрозы составили 52%, кровотечения и кровоизлияния – 15,6%, гематомы – 32,5%. Таким образом, гемартроз – самая распространенная проблема у больных гемофилией, и среди преимущественных поражений стоит на первом месте независимо от вида терапии. Кровотечения и кровоизлияния в настоящее время встречаются в 2 раза реже, причем в основном посттравматические, тогда как ранее преобладали кровотечения спонтанного характера. Гематомы отмечены примерно в равном соотношении в обеих группах. Среди осложнений гемофилии преобладает постгеморрагическая анемия, данное состояние отмечено в 46,8% случаев среди больных первой группы против 30,6% случаев у детей второй группы. Кроме того, у больных, получавших факторы свертывания, отсутствуют такие серьезные осложнения, как вирусный гепатит и контрактуры суставов, которые встречались в предыдущие годы в основном в подростковом возрасте.

Основной проблемой лечения гемофилии является развитие ингибиторной формы, которая является одним из серьезных осложнений, требующих дорогостоящего лечения, а получение адекватного гемостаза у таких больных вызывает значительные трудности. В возникновении ингибитора играют роль следующие факторы: вид лечения, интенсивность терапии, количество введений препарата, возраст больного на момент первого введения. Задачами лечения ингибиторной гемофилии являются: увеличение продолжительности жизни и повышение ее качества, минимизация повреждения суставов.

В нашей практике наблюдается больной в возрасте 3 лет с ингибиторной формой гемофилии А. В возрасте 4 месяцев ребенку был установлен диагноз гемофилии, отмечался эпизод кровотечения, в плане лечения получил 4 введения плазменного препарата Иммунат, в возрасте 6 месяцев при обследовании был выявлен ингибитор в количестве 1040 ВЕ. В дальнейшем в терапии применялись препараты шунтирующего действия (НовоСэвен, Фейба), курсы плазмафереза, внутривенный иммуноглобулин (Октагам), в настоящее время уровень ингибитора составляет 134 ВЕ. Профилактическое лечение препаратами шунтирующего действия позволило сократить эпизоды кровоточивости, проявляющиеся в образовании небольших гематом мягких тканей, сократилось количество кровоизлияний в суставы-мишени, что улучшило качество жизни нашего ребенка.

## Заключение

Современная терапия концентратами факторов свертывания крови, получаемых из плазмы крови человека или с помощью рекомбинантной технологии, привела к уменьшению степени выраженности клинических симптомов заболевания, определяя благоприятный прогноз в отношении спонтанных гемартрозов, а также таких осложнений, как постгеморрагическая анемия, частота которых значительно уменьшилась. Эффективность терапии проявилась и в отсутствии в клинике гемофилии развития тяжелых артропатий, столь характерных для боль-





ных в предыдущие годы. Развитие ингибитора является самым серьезным осложнением, связанным с лечением факторами свертывания крови, что требует своевременной и тщательной диагностики. Наличие ингибитора необходимо определять у каждого больного независимо от степени тяжести гемофилии перед началом и в процессе лечения.

#### Выводы

Терапия концентратами факторов свертывания крови отличается более высокой эффективностью и отсутстви-

ем таких серьезных осложнений, как трансмиссивные инфекции, вирусный гепатит и формирование тяжелых артропатий.

Терапия концентратами свертывания крови приводит к снижению уровня инвалидизации больных гемофилией, улучшению качества жизни данной группы пациентов.

Адекватное применение концентратов факторов свертывания крови при терапии гемофилии приводит к значительному снижению госпитализаций, к сокращению сроков пребывания больного в стационаре.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Румянцев А.Г., Самочатова Е.В. (ред.). Практическое руководство по детским болезням. Гематология/онкология детского возраста. - М.: Медпрактика-М. - Т.4. - 2004. - 792 с.
2. Гемофилия у детей. Клиника, диагностика, лечение: Пособие для врачей гематологов/ Лаврентьева Н.Н., Якунина Л.Н., Агеенкова Э.В. и др. - М., 2003. - 32 с.
3. Воробьев А.И., Плющ О.П., Баркаган З.С. и др. Протокол ведения больных. Гемофилия// Проблемы стандартизации в здравоохранении -2006. -№3: -С.18-74.
4. Лобанова Е.В. Медико-статистические характеристики гемофилии у детей и экономическое обоснование специализированной помощи: Автореф. дис.... канд. мед наук. - М., 2002. - 24с.

ПОСТУПИЛА: 09.10.2010



УДК: 616-006.487:615-032.277.3: 612.1-053.2

**Козель Ю.Ю., Нестерова Ю.А., Кузнецов С.А., Сиденко Л.Ю., Арсамакова Х.Х.**

## **ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОБЛАСТОМ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ (ПО МАТЕРИАЛАМ ОТДЕЛЕНИЯ ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ РНИОИ ЗА 2001–2009 ГОДЫ)**

*ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»  
Минздравсоцразвития России, отделение детской онкологии,  
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63, тел. (863)-250-29-71*

Цель: анализ клинического материала в группе пациентов с нейробластомой за период с 2001 по 2009 годы, обобщение материалов, оценка результатов лечения.

Материалы и методы: основу исследования составили 79 пациентов с нейроэктодермальными опухолями.

Результаты: пациенты проанализированы в зависимости от пола, возраста, стадии заболевания, факторов прогноза, по локализации первичного очага и вторичных поражений. Оценены непосредственные и отдаленные результаты лечения нейробластомы с применением различных режимов комплексного лечения, в том числе с введением цитостатиков на аутосредах организма (аутокровь, аутоплазма): АГХТ-аутогемохимиотерапия, АПХТ-аутоплазмохимиотерапия, а также с применением биотерапии (препараты трансретиновой кислоты).

Выводы: большинство пациентов (85%) на момент постановки диагноза имеют III и IV стадии онкологического процесса, из них 50% заболевших – дети до 3-х лет. При локализованных стадиях опухолевого процесса 100% пациентов живы с разными сроками наблюдения. Выживаемость детей с III и IV стадией заболевания не превышает 20%. Лечение данной категории пациентов остается сложной, нерешенной проблемой. Эффективность биотерапии требует дальнейших изучений.

*Ключевые слова:* дети, нейробластома, лечение, аутосреды, биотерапия.

**Kozel Yu.Yu., Nesterova Yu.A., Kuznetsov S.A., Sidenko L.Yu., Arsamakova H.H.**

## **EXPERIENCE OF NEUROBLASTOMA TREATMENT IN CHILDREN AND TEENAGERS (MATERIALS OF PEDIATRIC ONCOLOGY DEPARTMENT OF ROSTOV CANCER RESEARCH INSTITUTE FOR 2001–2009)**

*Federal State Institution “Rostov Cancer Research Institute”  
Ministry of Health and Social Development of Russia,  
Pediatric Oncology Department*

*63, 14 Line, Rostov-on-Don, 344037, Russia, tel. +7(863) 250-29-71*

Purpose: Analysis of clinical material in the group of patients with neuroblastoma for the period 2001-2009, summary of the material, assessment of treatment results.

Materials and Methods: 79 patients with neuroectodermal tumours.

Results: Patients have been analyzed depending on sex, age, stage of the disease, prognostic factors, site of the primary focus and secondary affection. We analyzed immediate and long-term results of neuroblastoma treatment with various regimes of complex treatment including administration of cytostatics on automeia of organism (autoblood, autoplasm): AHCT - autochemotherapy, APCT - autoplasmochemotherapy, as well as use of biotherapy (chemicals of transretinoic acid).

Summary: Most patients at the time of diagnosis are III and IV stages of cancer (85-90%); 50% of affected children under three years old. When localized stage 100% of the patients are alive with different period of observations. Child survival with III and IV stage disease should not exceed 20%. Treatment of this category of patients remained difficult challenges. Effectiveness requires further study of biotherapy.

*Keywords:* Children, neuroblastoma, treatment, automeia, biotherapy



## Введение

**Н**ейробластома – это злокачественная опухоль, которую впервые описал в 1865 году Вирхов, назвав ее «глиомой». В 1910 году Wright доказал, что развивается она из эмбриональных нейробластов симпатической нервной системы и дал ей настоящее название. Что же собой представляет классическая нейробластома в современном понимании? L.P. Dehner приводит следующие критерии, характеризующие данную злокачественную опухоль: 1) это эмбрионального типа мелко-крупноклеточная опухоль, которая содержит разное количество нейропиля и возникает из клеток-предшественников нервного гребешка в симпатической нервной системе, мозговом веществе надпочечников или симпатических ганглиях; 2) у пациентов с нейробластомой увеличена продукция катехоламинов и/или их метаболитов; 3) нейробластома наиболее часто возникает у детей раннего возраста.

Нейробластома – одна из наиболее частых детских опухолей, занимает 4 место после острых лейкозов, опухолей ЦНС и злокачественных лимфом. В структуре всей онкологической заболеваемости нейробластома составляет 7-11% от общего числа злокачественных опухолей у детей. У детей первого года жизни на ее долю приходится до 50% от всей злокачественной онкопатологии. Частота встречаемости нейробластомы составляет 0,85-1,1 на 100 000 детей до 15 лет и 6,1 на 100 000 детей в возрасте до года. Средний возраст детей на момент установления диагноза составляет 22 месяца, 97% заболевших находится в возрасте до 10 лет и 85% – до 4 лет.

Мальчики болеют несколько чаще, чем девочки (соотношение 1,2:1). В надпочечнике нейробластома встречается в 32% случаев, в паравертебральном забрюшинном пространстве – в 28%, в заднем средостении – в 15%, в крестцово-копчиковой зоне таза – в 5,6% и на шее – в 2%, прочие органы – казуистически.

Нейробластома имеет тенденцию к раннему, бурному метастазированию в кости, костном мозге, лимфатических узлах. Более редко отсева опухоли встречаются в коже и печени, мягких тканях, селезенке, и, как исключение, поражается головной мозг.

Различают три типа опухолей, происходящих из нейrogenной ткани, отличающихся степенью дифференциации. Ганглионеврома состоит из зрелых ганглионарных клеток и относится по своей природе к доброкачественным опухолям. Она часто обывествляется. Kemshead et al. (1985) полагают, что все ганглионевромы – это зрелые нейробластомы.

В литературе описаны случаи спонтанного или лечебного созревания нейробластомы до ганглионевромы (Everson и Cole, 1966). Данное явление встречается приблизительно в 1 случае из 100 наблюдений, факторы, приводящие к данному явлению, остаются неизвестными. Ганглионейробластома – это промежуточная форма неоплазмы, лежащая между ганглионевромой и нейробластомой. Зрелые ганглионарные клетки и недифференцированные нейробластомы развиваются в различных отделах опухоли и в разных пропорциях. Нейробластома является недифференцированной формой неоплазмы, состоящей из мелких круглых клеток с темно-пятнистыми ядрами. Часто могут встречаться розетки и характерные нейрофибрилы. В опухоли обнаруживаются геморрагии и участки кальцификации [1].

Клиническая картина заболевания зависит от локализации первичной опухоли, от наличия и локализации

метастазов, от количества вазоактивных веществ, продуцируемых опухолью. Основными жалобами являются боль (у 30–35%), лихорадка (25–30%), потеря веса (20%). Наличие жалоб и их число, главным образом, зависит от стадии заболевания. Так, по данным немецких коллег, бессимптомное течение нейробластомы было зарегистрировано у больных с 1 стадией в 48% случаев, с 2-ой стадией – у 29%, с 3 – у 16%, с 4 – лишь у 5%, при 4S – у 10% больных. Поражение шейно-грудного отдела симпатического ствола рано вызывает синдром Горнера, что делает возможным сравнительно раннюю диагностику опухоли, развивающихся из этих отделов.

Локализация опухоли в заднем средостении может стать причиной навязчивого кашля, дыхательных расстройств, деформации грудной стенки, может вызвать дисфагию, а у малышей – частые срыгивания. Поражение костного мозга влечет за собой анемию и геморрагический синдром. Характерен симптом «очков» с экзофтальмом при поражении ретробульбарного пространства у детей в 4 стадии заболевания. Метастазы в кожу имеют синюшно-багровую окраску и плотную консистенцию.

При локализации процесса в забрюшинном пространстве пальпация выявляет бугристую, каменистую плотности, практически несмещающую опухоль (ранняя фиксация опухоли происходит из-за быстрого врастания в спинномозговой канал через межпозвоночные отверстия). Распространение опухоли из грудной полости в забрюшинное пространство через диафрагмальные отверстия вызывает тот же симптом «песочных часов» или «гантелей». У детей более старшего возраста развитие метастазов может вызвать боли в костях и увеличение лимфатических узлов. Иногда заболевание имеет признаки, характерные для лейкемии, т. е. у детей развиваются анемия и кровоизлияния на слизистых оболочках и коже, что обуславливается панцитопенией, вызванной поражением костного мозга клетками нейробластомы. Метаболические изменения, развивающиеся в результате роста опухоли, ведут к появлению ряда общих симптомов. Так, в результате повышения уровня катехоламинов и, иногда, вазоактивных интестинальных пептидов (VIP) у детей могут появляться приступы потливости и бледности кожных покровов, сопровождающиеся жидким стулом и гипертонией. Эти симптомы могут проявляться независимо от локализации бластомы, и их интенсивность снижается при успешном лечении больного [2].

Согласно международным критериям диагноз нейробластомы может быть установлен по гистологическому исследованию биопсийного материала, полученного из первичной опухоли, (либо из метастазов), или при выявлении поражения костного мозга в сочетании с повышенным содержанием катехоламинов или их дериватов: ванилилминдальной (ВМК), гомованилиновой (ГВК) кислот и дофамина в крови или в моче. Уровни ВМК и ГВК повышены у 85% больных и уровень дофамина – у 90% больных с нейробластомой. Уровень экскреции катехоламинов не влияет на прогноз, тогда как высокое соотношение ГВК:ВМК (зависимость прямо пропорциональна) свидетельствует о наличии низко дифференцированной опухоли и связано с неудовлетворительным прогнозом.

Возраст при установлении заболевания является ведущим прогностическим фактором. Так, у детей до 1 года течение заболевания всегда более благоприятно. Далее, значимыми признаками, влияющими на прогноз, являются стадия и первичная локализация нейробластомы, на-



личие амплификации тус-антигена. Прогноз у больных со стадией I и IVS, определенной согласно международной классификации INSS, значительно более благоприятный по сравнению с детьми, имеющими другие стадии заболевания.

Так, при I и IVS стадиях нейробластомы более 5 лет живут, соответственно, 90% и более 80% детей после лечения, в то время как при стадиях IIА и В, III и IV этот показатель равняется 70–80%, 40–70% и 60% – в возрасте до 1 года, 20% – в возрасте более 1 года и 10% – в возрасте 2 и более лет. При этом хотелось бы отметить, что 80% детей поступают в специализированную клинику в III–IV стадиях заболевания [3],[4].

### Материалы и методы

В отделении детской онкологии РНИОИ за период с 2001 по 2009 год находились под наблюдением и на лечении 79 пациентов с нейроэктодермальными опухолями. В 71 (90%) случаях была верифицирована нейробластома, в 3 (3,7%) – эстезионеробластома, в 3 (3,7%) – ганглионеробластома, у 2-х пациентов злокачественная параганглиома (2,6%).

Девочек наблюдалось 39 (49%), мальчиков 70 (51%). Соотношение по полу составило 1: 1,02.

Средний возраст пациентов составил 5,7 лет. В зависимости от возраста пациенты распределились следующим образом: до 1 года – 22 ребенка (28%), от 1 года до 3-х лет – 21 ребенок (27%), от 3-х до 7 лет («дошкольники») – 14 пациентов (17%), 7–10 лет – 5 (6,5%), 10–15 лет – 5 (6,5%), подростки старше 15 лет и лица молодого возраста – 12 (15%). Таким образом, 55% пациентов были в возрасте от рождения до 3-х лет, что соответствует литературным данным.

Всем пациентам проводилось комплексное обследование, включавшее: общеклиническое обследование, УЗИ органов брюшной полости, забрюшинного пространства, малого таза, зон лимфатических узлов, СРКТ органов грудной клетки, средостения, МРТ головного мозга (по показаниям), миелограмма из 3-х точек, остеосцинтиграфия, ЭКГ, эндоскопические гормональные, иммунологические исследования. Всем пациентам проводился анализ уровня суточных уринарных катехоламинов. Повышение уровня ДОФА, дофамина, норадреналина, адреналина в различных сочетаниях отмечено у 68% пациентов. Исследование уровня данных онкомаркеров производилось также на различных этапах лечения с целью определения эффективности проводимой терапии.

Исследования амплификации тус-антигена и сканирования с метайодобензилгуанидином (MIBG) мы не проводили из-за отсутствия технической оснащенности для данных видов исследования. Поэтому изначально прогностические факторы оценивались неполностью.

### Результаты

Из 79 пациентов I стадию онкологического процесса согласно классификации INSS имели 6 пациентов (7,6%), II стадию – 4 пациента (5,2%), местнораспространенную III стадию – 18 больных (22%). Генерализованная IV стадия заболевания на момент установления диагноза была определена 50 пациентам, что составило 63%. Таким образом, у 68 пациентов (86%) заболевание было диагностировано в запущенной стадии заболевания, когда эф-

фективность даже самого современного комплексного лечения очень низкая. У одной пациентки до 1 года при проведении профилактического УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства была заподозрена забрюшинная опухоль с метастатическим поражением печени. При дообследовании в ОДО РНИОИ ребенку была выставлена IVS стадия заболевания.

Запущенность онкологического процесса у пациентов до 1 года была еще более выраженной. Из 22 пациентов I стадии онкологического процесса диагностировано не было, II стадию заболевания имел 1 пациент (4,5%), местнораспространенную III стадию – 5 больных (23%), генерализованную IV стадию – 15 пациентов (68%), IVS стадию – 1 ребенок (4,5%). Таким образом, 91% пациентов имели на момент установления диагноза местнораспространенную и генерализованные стадии онкологического процесса. Учитывая данные факты можно констатировать очень низкую настороженность врачей-педиатров общей лечебной сети, родителей, отсутствие повсеместно УЗИ-метода исследования как скрининга на наличие опухолевого процесса в брюшной полости и забрюшинном пространстве. Скрытое течение заболевания, особенности анатомо-физиологических особенностей ребенка новорожденного и грудного возраста также не способствуют выявлению заболевания на ранних стадиях.

У 44 пациентов с нейробластомой (55%) первичный опухолевый очаг локализовался в забрюшинном пространстве, в задних отделах средостения опухоль отмечена у 16 пациентов (20%), из симпатических ганглиев в области шейного отдела позвоночника развилась опухоль у 3 пациентов (3,7%), опухоль локализовалась в крестцово-копчиковой области, с вовлечением м/тканых структур малого таза у 5 больных (6,3%), по одному наблюдению имеет место первичное поражение крыла носа (1,2%), орбиты (1,2%), костей теменно-височной области черепа с интра- и экстракраниальным ростом (1,2%). Эстезионеробластома с распространением на орбиту отмечена у 1 пациентки (1,3%), в 2-х наблюдениях (2,6%) имелась эстезионеробластома с распространением на основании черепа. У всех больных отмечалось метастатическое поражение отдаленных лимфатических узлов. У 3-х пациентов (3,9%) с ганглионеробластомой опухолевый процесс локализовался в забрюшинном пространстве. В 2-х наблюдениях злокачественные параганглиомы локализовались забрюшинно (2,6%). Таким образом, приведенные выше данные соответствуют общепринятым, так как в нашем исследовании большинство первичных опухолей локализовалось в забрюшинном пространстве (надпочечники, паравертебральные зоны забрюшинного пространства) и в области задних отделов средостения.

У пациентов в возрасте до 1 года отмечалась сходная картина. В 14 наблюдениях (64%) опухолевый процесс располагался забрюшинно и в 6 (27%) – в области заднего средостения.

С учетом распространенной стадии онкологического процесса метастатическое поражение одного органа имело место в 22 наблюдениях (44%), у 28 пациентов (56%) метастатическое поражение было множественным: кости, костный мозг, легкие и т.д. У одной пациентки 4 месяцев отмечено метастатическое поражение 5 органов и тканей одновременно. Наиболее часто метастазами поражен костный мозг – 19 наблюдений, отдаленные лимфатические узлы – у 16 больных, метастатическое поражение костей – у 15, легких – у 10, печени – у 6, мягких тканей – у 4, головного мозга – у 2, кожи – у 2, метастатическое по-



ражение плевры с развитием геморрагического плеврита – у 1, поражение селезенки – в одном наблюдении.

У детей до 1 года наиболее часто метастазы локализовались в отдаленных лимфатических узлах – 9 больных, в печени – 5, костях – 4, костном мозге и легких – по 3 случая, в головном мозге – 1 наблюдение.

Всем пациентам с I стадией опухолевого процесса проведено оперативное лечение в объеме радикального удаления первичной опухоли. Все пациенты на настоящий момент живы без признаков генерализации. Общая бессобытийная выживаемость составляет 100%. Сроки наблюдения от 3 месяцев до 9 лет.

Пациентам со II-IV (IVS) стадиями опухолевого процесса проводили комплексное лечение в зависимости от операбельности процесса. При операбельном процессе первым этапом проводили индукционную высокодозную ПХТ с введением цитостатиков на аутосредах организма (аутогемохимиотерапия – АХГТ, аутоплазмохимиотерапия – АПХТ), 2 этап – локальный контроль (оперативное лечение + ДГТ по радикальной программе), консолидирующая ПХТ, иммунотерапия, биотерапия с применением препаратов трансретиноевой кислоты (весанонид, роаккутан).

При неоперабельности опухолевого процесса проводилась высокодозная химиотерапия, локальный контроль на область первичного опухолевого очага с использованием ДГТ, биотерапия.

Особенность проводимого цитостатического лечения заключалась в том, что цитостатики вводились либо на аутокрови (не более 5%ОЦК на одно введение), либо на аутоплазме (на 1 курс лечения забирали не более 10% ОЦП). В процессе лекарственной терапии в основном использовались 2 программы дозоинтенсивной цитостатической терапии: альтернирующие курсы винкристина+доксирубицин+циклофосфан / этопозид+ карбоплатин, а также схема лекарственной терапии для лечения нейробластом (NB-99) с использованием высоких доз винкристина + доксорубицина + циклофосфана + этопозид + цисплатина. В случае плохого ответа на вышеприведенные схемы лекарственной терапии применяли индивидуальные схемы лекарственного лечения.

Первым этапом лечения у 2-х пациентов со II стадией нейробластомы проведено радикальное хирургическое лечение. Вторым этапом проводилась ДГТ на ложе удаленной опухоли с последующими курсами адьювантной АГХТ. Одному ребенку до 1 года, учитывая неоперабельность опухолевого процесса, было проведено химио-лучевое лечение с полным клиническим ответом. Еще у одной пациентки со II стадией была верифицирована злокачественная параганглиома забрюшинного пространства. Ей было проведено радикальное хирургическое лечение и этап локального контроля в виде ДГТ на ложе удаленной опухоли. На настоящий момент все пациенты находятся под наблюдением в 3 клинической группе. Таким образом, общая бессобытийная выживаемость составляет 100%. Сроки наблюдения составляют от 3 –х до 6 лет.

Всем 18 пациентам с III стадией нейробластомы лечение начинали с индукционной высокодозной ПХТ.

В случае выраженного клинического ответа от проведенных 4-6 курсов цитостатической терапии и операбельности опухолевого процесса 2 этапом лечения выполняли хирургическое вмешательство. Таких пациентов в нашем исследовании было 10 (55%), затем всем проводили ДГТ и 4-6 курсов индукционной терапии. В данной группе па-

циентов в настоящий момент живы 8 человек, 2 пациента погибли на различных сроках от генерализации процесса. У 6 (33%) больных процесс был неоперабельным. Этой группе пациентов проводили химио-лучевое лечение. В результате проведенной терапии в настоящий момент 2 пациента из данной группы находятся в клинико-лабораторной ремиссии, 4 пациента погибли от генерализации опухолевого процесса.

Таким образом, из 18 пациентов с III стадией нейробластомы в настоящий момент в 3 клинической группе находится 10 человек, общая выживаемость составляет 55%, причем в группе прооперированных больных она составляет 80%, а в группе неоперабельных пациентов всего 33%, что указывает на четкие связи между операбельностью и выживаемостью среди данной категории пациентов. Сроки общей выживаемости варьируют от 1 года до 8 лет.

Два пациента (11%) с III стадией нейробластомы в настоящий момент продолжают комплексное лечение.

Самой многочисленной была группа пациентов с генерализованной IV стадией опухолевого процесса (63% от всех наблюдений) – 50 детей и подростков. Из них 15 пациентов были в возрасте до 1 года (30%). Также как и пациенты с местнораспространенным процессом, все пациенты из данной группы получали интенсивное комплексное лечение.

Лечение детей с IV стадией нейробластомы начинали с индукционной высокодозной ПХТ.

После оценки эффективности индукционной АГХТ или АПХТ 13 пациентам (26%) было проведено радикальное хирургическое лечение. Следующим этапом проводили ДГТ и 4-6 курсов высокодозной индукционной терапии. В данной группе пациентов в настоящий момент живы 5 человек, из них 3 пациента до 1 года. Погибло на различных этапах лечения и наблюдения от прогрессии опухолевого процесса 8 пациентов.

У 30 (60%) пациентов опухолевый процесс был неоперабельным. Этой группе пациентов проводили химио-лучевое лечение. В результате проведенной терапии в настоящий момент живы 5 пациентов из данной группы, из них до 3 пациента на момент установления диагноза имели возраст до 1 года. У всех пациентов констатирована в настоящий момент стабилизация опухолевого процесса, лабораторная ремиссия. Погибло от прогрессирования заболевания на различных сроках наблюдения 25 пациентов.

Таким образом, общая выживаемость среди пациентов с генерализованным опухолевым процессом составила 20% – 10 пациентов, а для детей до 1 года этот показатель составляет 40% – 6 пациентов из 15. Сроки наблюдения составили при данной стадии опухолевого процесса от 1,5 лет до 4-х лет.

Продолжают лечение 7 человек с IV стадией нейробластомы.

У одной пациентки до 1 года при профилактическом УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства была диагностирована опухоль забрюшинного пространства. При проведении комплексного обследования в ОДО РНИОИ был установлен диагноз нейробластомы забрюшинного пространства с множественными метастазами в печень. По результатам обследования у девочки была установлена IVS стадия опухолевого процесса. Ребенок был отнесен в группу низкого риска с благоприятным прогнозом. После проведения радикального хирургического вмешательства было проведено 4 курса



монокимиотерапии циклофосфаном. В настоящее время пациентка в течение 2-х лет находится в полной клинико-лабораторной ремиссии.

У одной пациентки с IV стадией нейробластомы заднего средостения с метастатическим поражением головного мозга, печени, кожи, селезенки, забрюшинных лимфатических узлов после 3-х курсов индукционной терапии отмечено прогрессирование опухолевого процесса. Специфическая терапия была прекращена. Однако в последующие 9 месяцев произошло регрессирование клинических проявлений опухолевого процесса, что документировано СРКТ, УЗИ, клиническими исследованиями. В полной клинико-лабораторной ремиссии ребенок находится в течение 4 лет. Данное наблюдение было интерпретировано как спонтанное созревание нейробластомы.

После завершения основного курса комплексной терапии у 16 пациентов применялись препараты транс-ретиноевой кислоты: весаноид, роаккутан. Живы из этой группы 13 пациентов (81%). Малочисленность данной клинической группы, разнородность по возрасту, стадиям онкологического процесса среди пациентов, небольшие сроки наблюдения, а также то, что данный вид биотерапии проводился в основном у детей с полным или выраженным клиническим эффектом, не позволяют сделать четких выводов об эффективности данного вида терапии и требуют дальнейшего изучения.

#### Выводы

Таким образом, анализируя вышеизложенную информацию, можно сделать вывод о том, что до 85% пациентов

в общей группе и до 91% (!) пациентов до 1 года имеют на момент установления диагноза местно-распространенную и генерализованную стадии опухолевого процесса. В возрасте от рождения до 3-х лет заболевает 55% детей. Пациенты с локализованными стадиями опухолевого процесса (I и II стадия) имеют очень высокие шансы на излечение. В нашем наблюдении 100% пациентов с данными стадиями заболевания живы. Сроки наблюдения составляют от 3 месяцев до 9 лет. Представляется актуальным создания алгоритма УЗ скринингового исследования органов брюшной полости и забрюшинного пространства у детей до 1 года в условиях поликлиники, что может способствовать более ранней диагностики забрюшинных опухолей у детей раннего возраста.

Лечение пациентов с местнораспространенными и генерализованными стадиями нейробластомы представляет собой очень сложную проблему. Особенно среди неоперабельных пациентов. Общая выживаемость в этой группе составляет 20%. Однако малые сроки наблюдения за данной клинической группой не позволяют сделать окончательных выводов. Более обнадеживающие показатели выживаемости среди пациентов с IV стадией нейробластомы в возрасте до 1 года (40%), что не противоречит литературным данным.

Проведение биотерапии в качестве компонента комплексного лечения нейrogenных опухолей представляется нам очень актуальным и требует дальнейших глубоких исследований (гормональных, иммунологических, морфологических и др.), т. к. опухоль имеет уникальную способность к «самосозреванию», особенно среди детей раннего возраста.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Опухоли и опухолеподобные процессы у детей /Под редакцией Е.Д. Черствого, Г.И. Кравцовой, А.В. Фурманчука. - Минск «Асар», 2002. - С.125-133.
2. Л.А.Дурнов, Г.В. Голдобенко. Детская онкология. - М.: «Медицина», 2005. - С.327- 341.
3. Детская гематология и онкология. Под редакцией Ф.Ланцковского. - М.: «ЛОРИ», 2005. - С. 484-504.
4. Pizzo P., Poplack D. Pediatric oncology. - 2003. - P.1282-1299.

ПОСТУПИЛА: 08.10.2010



Симованьян Э.Н., Сарычев А.М., Денисенко В.Б., Григорян А.В.  
**ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ СИНДРОМ  
В ПРАКТИКЕ ПЕДИАТРА-ИНФЕКЦИОНИСТА**

ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Росздрава»,  
кафедра детских инфекционных болезней

Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: detinfrostov@gmail.com

Хроническая Эпштейна-Барр вирусная инфекция (ХЭБВИ) является частой причиной лимфопролиферативного синдрома (ЛПС) у детей.

Цель: охарактеризовать наиболее информативные критерии диагностики ХЭБВИ у детей с учетом возраста и формы заболевания.

Материалы и методы: обследованы 168 детей в возрасте от 3 до 7 (116) и от 7 до 14 лет (52) с моно-ХЭБВИ (70) и смешанной с хламидиозом ХЭБВИ (98).

Результаты: У всех пациентов имели место группы риска в антенатальном, интранатальном и постнатальном периодах. ЛПС обнаружен у 100% детей и характеризовался сочетанием генерализованной лимфаденопатии, гепатомегалии, спленомегалии с гипертрофией глоточной и небных миндалин. Помимо ЛПС синдромальная модель ХЭБВИ включала интоксикационный синдром, поражение респираторного и желудочно-кишечного трактов, центральной нервной системы (ЦНС), сердечно-сосудистой системы и артралгический синдром. У детей раннего возраста ХЭБВИ характеризовалась высокой частотой групп риска, гипертрофии глоточной миндалин, гепатомегалии, фаринготонзиллита и поражения ЦНС. У пациентов с микст-ХЭБВИ обнаружена высокая частота групп риска, гипертрофии небных миндалин, патологии респираторного и гастроинтестинального трактов, ЦНС.

Заключение: Группы риска и клинические симптомы ХЭБВИ являются показанием для обследования методами ИФА и ПЦР.

*Ключевые слова:* лимфопролиферативный синдром, Эпштейна-Барр вирусная инфекция, дети.

Simovanyan E.N., Sarychev A.M., Denisenko V.B., Grigoryan A.V.

**LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME  
IN PEDIATRICIAN AND INFECTIOLOGIST PRACTICE**

Rostov State Medical University

Department of Children Infectious Diseases

29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: detinfrostov@gmail.com

Chronic Epstein-Barr virus infection (CEBVI) is the frequent infectious cause of lymphoproliferative syndrome (LPS) in children.

Purpose: To characterize the most informative CEBVI diagnostic criteria in children according to age and disease form.

Materials and Methods: 168 children in age from 3 to 7 (116) and from 7 to 14 years old (52) with mono-CEBVI (70) and chlamydia mixed CEBVI (98) were examined.

Results: Antenatal, intranatal and postnatal risk groups in all patients were exposed. LPS was detected in 100% children and characterized by combination of generalized lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly with palatine and pharyngeal tonsil hypertrophy. Except LPS, CEBVI syndromal model was included intoxication syndrome, respiratory and gastrointestinal tracts, central nervous system (CNS), cardiovascular system affection and arthralgia syndrome. CEBVI in young children was characterized by frequent risk groups, palatine tonsil hypertrophy, hepatomegaly, pharyngotonsillitis and CNS affection. In patients with mixed CEBVI, high frequency of risk groups, pharyngeal tonsil hypertrophy, hepatomegaly, splenomegaly, respiratory and gastrointestinal tract, CNS pathology was detected.

Summary: Risk groups and clinical symptoms of CEBVI are the indication for ELISA and PCR examination.

*Keywords:* lymphoproliferative syndrome, Epstein-Barr virus infection, children

### Введение

Лимфопролиферативный синдром (ЛПС) является причиной обращения за медицинской помощью 3,4% пациентов детского возраста [1]. Однако при клиническом обследовании детей, посещающих организованные коллективы, ЛПС выявляют с гораздо более высокой частотой – у 15-20% [2]. ЛПС

возникает при широком спектре инфекционных и неинфекционных заболеваний, что определяет необходимость проведения дифференциальной диагностики. Необходимо учитывать, что ЛПС встречается не только у детей с инфекционной патологией, но и является одним из клинических признаков гемобластозов (лейкемии, неходжкинских и ходжкинских лимфом, болезней альфа- и гамма-тяжелых цепей, гистиоцитарных синдромов), па-



ранеопластических реакций, первичных иммунодефицитов (общей вариабельной иммунной недостаточности, синдромов Вискотта-Олдрича, Чедиака-Хигаси, атаксии-телеангиэктазии, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, септического гранулематоза), болезней накопления (Ниманна-Пика, Гоше), генетической патологии (синдромов Клиппель-Треноре, Вевера-Смита, Мильроя, легочной мышечной гипертрофии) [1, 3, 4]. К неинфекционным причинам ЛПС относят также прием ряда медикаментов (производных гидантоина, аллопуринола, антиитероидных и противолепрозных препаратов), вакцинацию против кори, краснухи, атопический дерматит, гемолитическую анемию. ЛПС возникает при системных патологических процессах – коллагенозах, амилоидозе, синдроме Дорфмана-Розаи, десквамативной эритродермии Лейнера, при гранулематозах – саркоидозе, аллергическом гранулематозе Чарг-Штрауса, мультицентрическом ретикулоэритроцитозе, липомеланотическом ретикулезе (синдроме Паутриера-Ворингера).

В настоящее время установлено, что практически у половины детей (41,5%) ЛПС обусловлен инфекционными агентами [1, 3]. Инфекционные заболевания, сопровождающиеся появлением ЛПС, вызываются вирусами (ВИЧ-, аденовирусная, герпесвирусные инфекции, корь, краснуха), внутриклеточными патогенами (хламидиозы, хламидофилезы, микоплазмозы), бактериями (туберкулез, атипичный микобактериоз, бартонеллез, боррелиоз, сепсис), простейшими (токсоплазмоз, лейшманиоз, малярия), грибами (гистоплазмоз), гельминтами (эхинококкоз).

Исследованиями последних лет доказано, что у 74,5% детей с ЛПС инфекционной природы этиологическим агентом является вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) [5]. Основной клеткой-мишенью ВЭБ являются В-лимфоциты, которые превращаются в клетки, способные к неограниченной пролиферации [6, 7]. Возникает поликлональная активация В-лимфоцитов, что находит отражение в продукции гетерофильных антител и аутоантител к различным тканям. ВЭБ поражает также эпителий ротоглотки, протоков слюнных желез, шейки матки, желудочно-кишечного тракта, эндотелий сосудов и иммунокомпетентные клетки – Т-лимфоциты, естественные киллерные клетки, нейтрофилы, макрофаги. Способность вируса к пожизненной персистенции приводит к злокачественной трансформации клеток и индукции аутоиммунных заболеваний. Развитие глубокого вторичного иммунодефицитного состояния является причиной формирования хронических форм инфекционного процесса.

Хроническая Эпштейна-Барр вирусная инфекция (ХЭБВИ) развивается у 20-65% детей, перенесших острую ВЭБ-инфекцию, или имеет первично-хроническое течение [6]. Установлено, что одним из ведущих клинических синдромов ХЭБВИ является ЛПС [8]. Длительное течение ХЭБВИ, неблагоприятные последствия для организма ребенка диктуют необходимость своевременной клинической диагностики с учетом групп риска, синдромальной модели заболевания, проведения адекватного лабораторного обследования пациентов, назначения комплексной терапии, осуществления этапной реабилитации. Кроме того, в условиях иммуносупрессии (ВИЧ-инфекция, проведение цитостатической терапии и др.) достаточно часто происходит реактивация ХЭБВИ, что затрудняет проведение дифференциального диагноза. Вместе с тем до настоящего времени в современной литературе отсутствуют исследования, посвященные характеристике ЛПС и полиорганной патологии при ХЭБВИ у детей в возрастном аспекте.

Не менее важной является проблема ХЭБВИ, протекающей в форме смешанной инфекции. Установлено, у всех детей с ХЭБВИ имеют место различные вирусно-бактериальные ассоциации [6, 7]. В качестве ассоциантов при ХЭБВИ могут выступать хламидии, которые поражают различные клетки-мишени, обладают способностью к длительной персистенции, иммунодепрессивной активностью [9]. О значимости хламидий в качестве этиологических агентов смешанных инфекций свидетельствует факт обнаружения лабораторных маркеров активности этих возбудителей у 50,9% детей с хроническим аденоидитом [10]. Следует отметить, что особенности клинической симптоматики ХЭБВИ, протекающей в форме микст-инфекции с хламидиозом, до настоящего времени остаются неизученными.

Цель – охарактеризовать наиболее информативные критерии диагностики ХЭБВИ у детей с учетом возраста и формы заболевания.

### Материалы и методы

Обследованы 168 пациентов в возрасте от 3 до 14 лет с диагнозом ХЭБВИ, поставленным на основании клинико-anamnestических, молекулярно-генетических и серологических данных. К возрастной группе от 3 до 7 лет относились 116 человек (69%), от 7 до 14 лет – 52 пациента (31%). У 70 детей (41,7%) имела место моно-ХЭБВИ, у 98 больных (58,3%) – ХЭБВИ, протекавшая в виде смешанной инфекции с хламидиозом.

Осуществляли в изучение анамнеза, медицинской документации, объективное обследование больного. Параклиническое обследование включало общий анализ крови и общий анализ мочи, по показаниям – инструментальные методы исследования, консультации специалистов. Антитела классов IgM к VCA-, IgG к EA-, IgG к EBNA-антигенам ВЭБ, авидность IgG к EBNA, антитела классов IgA, IgM, IgG к Chl. pneumoniae, Chl. psittaci определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА, тест-системы «Вектор-Бест», Россия). ДНК ВЭБ в плазме крови и мазках из ротоглотки выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР, тест-системы «Ампли-сенс», Россия) с регистрацией полученных результатов на термомоцикле «Rotor Gene» (Австралия).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики. Достоверность различий показателей для абсолютных показателей оценивали критерий Стьюдента, для относительных величин – по тесту Фишера. Достоверными считали различия показателей при  $P < 0,05$ .

### Результаты исследования

Анализ преморбидного фона выявил наличие групп риска у всех пациентов независимо от возраста и формы заболевания. Достаточно часто регистрировалась патология беременности и родов у матерей (48,8% и 20,2%, соответственно). Гестоз первой и второй половин беременности диагностирован у 25,6% женщин, угроза прерывания беременности – у 41,1%, хроническая внутриутробная гипоксия плода – у 38,6%, анемия – у 2,4%. Большинство женщин во время беременности переносили острые инфекционные заболевания, в том числе острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) – 41,1%, первичную или реактивированную кожно-слизистую форму инфекции простого герпеса (ИПГ) – 45,2%. Осложненное течение





ние натального периода включало стремительные роды – у 20,2%, преждевременные роды – у 11,9%, оперативные вмешательства – у 10,7% женщин. Обращала внимание высокая частота соматических заболеваний (29,2%), аутоиммунной (7,1%) и аллергической патологии (14,3%) у матерей.

У обследованных детей независимо от возраста и формы ХЭБВИ имела место высокая частота фоновых состояний в периоде новорожденности (70,2%). У 13,1% пациентов диагностирована асфиксия, у 35,1% – затянувшаяся желтуха в периоде новорожденности. У 64,9% больных выявлены признаки перинатального поражения ЦНС (ППЦНС), протекавшего в форме гипертензионно-гидроцефального синдрома – у 39,9%, вегето-висцерального синдрома – у 20,8%, синдрома двигательных нарушений – у 19,3%, судорожного синдрома – у 19,6%, синдрома задержки психомоторного развития – у 11,9%.

У 21,4% пациентов обнаружены аномалии развития сердечно-сосудистой системы, в том числе дефект межжелудочковой, межпредсердной перегородок, открытый артериальный проток, дополнительные хорды. У 18,4% пациентов выявлены пороки развития мочевыделительной системы – каликоэктазия, удвоение почки, стриктуры мочеточника. У 20,2% детей диагностированы аномалии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в том числе перегиб шейки желчного пузыря, долихосигма, у 8,9% – эндокринная патология (гипотиреоз, сахарный диабет).

Обращала внимание высокая частота инфекционной и неинфекционной патологии в постнатальном периоде. Повторные ОРВИ с частотой 7,2±0,5 раз в год имели место у 44,6% больных, перенесенные острые бронхиты – у 28,5%, острые обструктивные бронхиты – у 19,6%, пнев-

монии – у 18,5 %, ангины – у 20,2 %. Острые кишечные инфекции (шигеллез, сальмонеллез, инфекции, вызванные условно-патогенной микрофлорой, ротавирусную инфекцию) перенесли 36,3% пациентов, клинически манифестные формы ИПГ – 11,3%, ветряную оспу – 27,4%. Следует отметить, что лишь 36,3% детей в анамнезе имели указания на перенесенный острый инфекционный мононуклеоз. У 11,3% больных выявлены различные аллергические заболевания (атопический дерматит, аллергический ринит, бронхиальная астма).

При объективном обследовании у всех больных независимо от возраста и формы ХЭБВИ выявлен ЛПС, включавший генерализованную лимфаденопатию (ГЛАП), гипертрофию небных и глоточной миндалин, гепатомегалию и спленомегалию (табл. 1). У 100% пациентов выявлена ГЛАП, которая характеризовалась увеличением размеров лимфоузлов затылочных (100%), заушных (57,7%), подчелюстных (100%), переднешейных (100%), заднешейных (100%), подбородочных (68,4%), надключичных (100%), подключичных (100%), подмышечных (100%), кубитальных (50%) и паховых групп (100%). Лимфоузлы были увеличены до 0,5-3,5 см в диаметре, имели плотно-эластическую консистенцию. В наибольшей степени были увеличены переднешейные лимфоузлы.

У всех пациентов выявлена гипертрофия небных миндалин, в том числе 1 степени – у 53%, 2-3 степени – у 47% детей. Боли в горле при глотании беспокоили 38,7% больных. При фарингоскопии умеренные воспалительные изменения слизистой оболочки миндалин обнаружены у 38,7% пациентов, выраженные воспалительные изменения – у 33,9%, гиперемия небных дужек – у 67,9% детей.

Таблица 1

Клиническая симптоматика ХЭБВИ с учетом возраста детей

Показатели	Возраст от 3 до 7 лет		Возраст от 7 до 14 лет		Все больные	
	п	%	п	%	п	%
<b>Лимфопролиферативный синдром:</b>	116	100	52	100	168	100
ГЛАП	116	100	52	100	168	100
Гипертрофия небных миндалин, в т.ч.	116	100	52	100	168	100
1 степени	55	47,4	34	65,4 <sup>1</sup>	89	53
2-3 степени	61	52,6	18	34,6 <sup>1</sup>	79	47
<b>Гипертрофия глоточной миндалины, в т.ч.</b>	116	100	52	100	168	100
1 степени	49	42,2	19	36,5	68	40,5
2-3 степени	67	57,8	33	63,5	100	59,5
Гепатомегалия	88	75,9	32	61,5 <sup>1</sup>	120	71,4
Спленомегалия	67	57,8	27	51,9	94	55,9
<b>Инттоксикационный синдром</b>	93	80,2	37	71,1	130	77,4
<b>Респираторный синдром:</b>	116	100	52	100	168	100
Ринофарингит	29	25	20	38,9 <sup>1</sup>	49	29,2
Фаринготонзиллит	87	75	33	63,5 <sup>1</sup>	120	71,4
Аденоидит	50	43,1	22	42,2	72	43
О. бронхит, о. обструктивный бронхит	32	27,6	28	53,8 <sup>1</sup>	60	35,7
О. пневмония	5	4,3	5	9,6	10	5,9
<b>Церебральный синдром:</b>	65	56	25	48,1	90	53,6
Гипертензионно-гидроцефальный синдром	40	34,5	22	42,3	62	36,9
Синдром дефицита внимания с гиперактивностью	35	30,2	6	11,5 <sup>1</sup>	41	24,4
Судорожный синдром	24	20,7	7	13,5	31	18,5
Вегето-висцеральный синдром	33	28,4	17	32,7	50	29,8
<b>Гастроинтестинальный синдром:</b>	68	58,6	29	55,8	97	57,7
Аномалии развития ЖКТ	41	35,4	13	25	54	32,1
Хронический гастрит	45	38,8	15	28,8	60	35,7
Дискинезия желчевыводящих путей	24	20,7	9	17,3	33	19,6
<b>Артралгический синдром</b>	37	31,9	20	38,5	57	33,9
<b>Кардиальный синдром</b>	45	38,8	14	26,9	59	35,1
<b>ВСЕГО</b>	<b>116</b>	<b>100</b>	<b>52</b>	<b>100</b>	<b>168</b>	<b>100</b>

1 - достоверность различий показателей у больных в возрасте от 3 до 7 и от 7 до 14 лет.



Гипертрофия глоточной миндалины обнаружена у 100% детей, в том числе 1 степени – у 40,5%, 2-3 степени – у 59,5% пациентов. Больных беспокоило затрудненное носовое дыхание при отсутствии или скудном отделяемом из носа. У 53,6% пациентов имела место гнусавость голоса, у 25% – снижение слуха, у 29,8% – нарушение обоняния.

Гепатомегалия выявлена у 71,4% детей, спленомегалия – у 55,9%. Край печени выступал на 1–3 (2,5±0,1) см ниже края реберной дуги, край селезенки – на 0,5–2 (1,5±0,1) см.

Помимо ЛПС клиническая картина ХЭБВИ включала разнообразную полиорганную патологию. У 77,4% больных имела место симптоматика интоксикационного синдрома – вялость, слабость, адинамия, снижение аппетита, субфебрилитет. У всех больных выявлено поражение респираторного тракта, в том числе ринофарингит – у 29,2%, фаринготонзиллит – у 71,4%, аденоидит – у 43%, острый бронхит, острый обструктивный бронхит – у 35,7%, острая сегментарная пневмония – у 5,9%. Церебральный синдром имел место у 53,6% пациентов и включал гипертензионно-гидроцефальный синдром – у 36,9%, синдром дефицита внимания с гиперактивностью – у 24,4%, судорожный синдром – у 18,5%, вегетовисцеральный синдром – у 29,8%. При исследовании электроэнцефалограммы у 50,6% больных обнаружена дисфункция мезодиаэнцефальной области головного мозга, у 47,6% – повышение биоэлектрической активности, у 41,1% – пароксизмальная активность стволового генеза, у 34,5% – эпиактивность, у 29,8% – признаки внутричерепной гипертензии.

К симптоматике гастроинтестинального синдрома (57,7% больных) относились аномалии развития ЖКТ – у 32,1%, хронический гастрит – у 35,7%, дискинезия желчевыводящих путей – у 19,6%. При ультразвуковом исследовании изменения паренхимы печени обнаружены у 59,5% больных, гипомоторная функция желчного пузыря – у 9,5%, гипермоторная функция желчного пузыря – у 10,1%, спазм сфинктеров желчного пузыря – у 11,9%, перегиб шейки желчного пузыря – у 10,7%. Артралгический синдром выявлен у 33,9% пациентов, кардиальный синдром (боли в области сердца, сердцебиение, нарушение ритма) – у 35,1%. Осложнения ХЭБВИ имели место у 29,8% больных, в том числе отиты – у 19,6%, синуситы – у 16,7%, патология мочевыделительной системы (пиелонефрит, цистит) – у 13,1% пациентов.

Сопоставление клинико-анамнестических показателей в возрастном аспекте показало, что особенностью преморбидного фона пациентов младшей возрастной группы являлась более высокая частота групп риска, в том числе у матерей – стремительных родов (21,4%), у детей – ППЦНС (69,8%), частых ОРВИ (50,9%) и острого инфекционного мононуклеоза (41,4%). К особенностям симптоматики ХЭБВИ у пациентов младшей возрастной группы относилась высокая частота гипертрофии небных миндалин 2-3 степени (52,6%), гепатомегалии (75,9%), фаринготонзиллита (75%), синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (30,2%). Частота эпизодов ОРВИ (10,9±1 раз в год) достоверно превышала аналогичный показатель в старшей группе (6,8±1,1; P<0,05).

Таблица 2

## Клиническая симптоматика ХЭБВИ с учетом формы заболевания

Показатели	Моно-ХЭБВИ		Микст-ХЭБВИ		Все больные	
	п	%	п	%	п	%
Лимфопролиферативный синдром:	70	100	98	100	168	100
ГЛАП	70	100	98	100	168	100
Гипертрофия небных миндалин, в т.ч.	70	100	98	100	168	100
1 степени	39	55,7	50	51	89	53
2-3 степени	31	44,3	48	49	79	47
Гипертрофия глоточной миндалины, в т.ч.	70	100	98	100	168	100
1 степени	41	58,6	27	27,62	68	40,5
2-3 степени	29	41,4	71	72,42	100	59,5
Гепатомегалия	42	60	78	79,62	120	71,4
Спленомегалия	30	42,9	64	65,32	94	55,9
Интоксикационный синдром	53	75,7	77	78,6	130	77,4
Респираторный синдром:	70	100	98	100	168	100
Ринофарингит	15	21,4	34	34,72	49	29,2
Фаринготонзиллит	55	78,6	64	65,32	120	71,4
Аденоидит	32	45,7	40	40,8	72	42,9
О. бронхит, о. обструктивный бронхит	9	12,9	49	50,2	60	35,7
О. пневмония	–	–	10	10,22	10	5,9
Церебральный синдром:	36	51,4	54	55,1	90	53,6
Гипертензионно-гидроцефальный синдром	18	25,7	44	44,92	62	36,9
Синдром дефицита внимания с гиперактивностью	21	30	20	20,4	41	24,4
Судорожный синдром	13	18,6	18	18,4	31	18,5
Вегето-висцеральный синдром	28	40	22	22,42	50	29,8
Гастроинтестинальный синдром:	39	55,7	58	59,2	97	57,7
Аномалии развития ЖКТ	16	22,9	38	38,82	54	32,1
Хронический гастрит	37	52,9	23	23,52	60	35,7
Дискинезия желчевыводящих путей	15	21,4	18	18,4	33	19,6
Артралгический синдром	24	34,3	33	33,7	57	33,9
Кардиальный синдром	28	40	31	31,6	59	35,1
ВСЕГО	70	100	98	100	168	100

2 - достоверность различий показателей у больных с моно- и микст-ХЭБВИ.



При изучении состояния преморбидного фона с учетом клинической формы заболевания установлено, что у больных с микст-ХЭБВИ с более высокой частотой в анамнезе встречались указания на хроническую внутриутробную гипоксию плода во время беременности у матери (50%). В периоде новорожденности чаще диагностированы затяжная желтуха (45,9%) и ППЦНС (73,9%), в постнатальном периоде чаще развивались пневмонии (30,6%), острые кишечные инфекции (49%) и ветряная оспа (36,7%). Частота эпизодов ОРВИ ( $9,4 \pm 1$  раз в год) достоверно превышала аналогичный показатель при моноинфекции ( $4,9 \pm 1,1$ ;  $P < 0,05$ ).

При клиническом обследовании у больных смешанной инфекцией чаще регистрировались гипертрофия глоточной миндалины 2-3 степени (72,4%), гепатомегалия (79,6%), спленомегалия (65,3%), ринофарингит (34,7%), бронхит (50%), пневмония (10,2%), гипертензионно-гидроцефальный синдром (44,9%) и аномалии ЖКТ (38,8%) (табл. 2). При моно-ХЭБВИ с более высокой частотой обнаруживали фарингит (78,6%), вегето-висцеральный синдром (40%) и хронический гастрит (52,9%).

### Выводы

Таким образом, ХЭБВИ в настоящее время является одной из наиболее частых причин развития ЛПС у детей. Обнаружение ЛПС у больного диктует необходимость проведения дифференциального диагноза с широким спектром инфекционной и неинфекционной патологии. Кроме того, реактивация ХЭБВИ может наблюдаться при онкогематологической патологии, на фоне цитостатической терапии. В связи с этим для своевременной диагностики ХЭБВИ необходимы тщательный анализ анамнестических данных, выявление особенностей ЛПС, дополнительных клинических синдромов, а также проведение углубленного лабораторного и инструментального обследования.

Следует учитывать, что ХЭБВИ развивается у детей с отягощенным преморбидным фоном за счет групп риска в антенатальном, интранатальном и постнатальном периодах. Ведущим клиническим синдромом является ЛПС, особенностью которого является сочетание ГЛАП, гепатомегалии, спленомегалии с гипертрофией лимфоидного ротоглоточного кольца (небных и глоточной миндалины), что придает ему черты хронического мононуклеозоподобного синдрома.

Помимо ЛПС синдромальная модель ХЭБВИ включает интоксикационный синдром, а также с разнообразной полиорганную патологию – поражение различных отделов респираторного тракта, ЦНС (гипертензионно-гидроцефальный, судорожный, вегетовисцеральный синдромы, синдром дефицита внимания с гиперактивностью), органов пищеварения (аномалии развития ЖКТ, хронический гастрит, дискинезия желчевыводящих путей), сердечно-сосудистой и опорно-двигательной систем.

При клинической диагностике необходимо учитывать особенности ХЭБВИ с учетом возраста детей и формы заболевания. Так, у пациентов младшей возрастной группы имеют место более высокая частота групп риска, выраженный ЛПС за счет гипертрофии небных миндалин 2-3 степени, гепатомегалии, чаще регистрируются фарингит, синдром дефицита внимания с гиперактивностью. О микст-ХЭБВИ свидетельствуют высокая частота ряда групп риска, более выраженный ЛПС за счет гипертрофии глоточной миндалины 2-3 степени, гепатомегалии, спленомегалии, а также особенности полиорганной патологии – поражение верхних и нижних отделов респираторного тракта, патология ЦНС (гипертензионно-гидроцефальный синдром), ЖКТ (аномалии развития).

Наличие у больного групп риска и клинических симптомов ХЭБВИ является показанием для углубленного обследования с использованием методов ИФА и ПЦР. При подтверждении диагноза ХЭБВИ пациенты нуждаются в проведении комплексной терапии, включающей сочетание средств этиотропной, патогенетической и симптоматической терапии под контролем клинико-лабораторных показателей. В качестве этиотропной терапии используют комбинацию инозина пранобекс (изопринозина) или аномальных нуклеозидов (ацикловира, валацикловира) с препаратами рекомбинантного интерферона (вифероном, генфероном лайт, кипфероном, реафероном-ЕС-липид) по пролонгированным схемам. В дальнейшем используют индукторы интерферона (амиксин, циклоферон, анаферон, кагоцел, неовир). Патогенетическая терапия ХЭБВИ включает иммунокорректирующие препараты, пробиотики, витаминно-минеральные комплексы, гепатопротекторы, энтеросорбенты, метаболические лекарственные средства. Указанный комплекс позволяет добиться клинико-лабораторной ремиссии у 95% пациентов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Практическое руководство по детским болезням. Том 4. Гематология и онкология детского возраста / под ред. В.Ф. Коколиной и А.Г. Румянцев. – М.: Медпрактика, 2004. – 792 с.
2. Маскова Г.Г., Черная Н.Л., Пушкарева Л.А. Эффективность индивидуальной реабилитации часто болеющих детей в условиях поликлиники // Поликлиника. – 2007. – № 1. – С. 32-34.
3. Козарезова Т.И., Климович Н.Н. Болезни крови у детей. – Мн.: Белорусская наука, 2001. – 384 с.
4. Basemore A.W., Smucker D.R. Lymphadenopathy and malignancy // Am. Fam. Phys. – 2002. – Vol. 66. – P. 2103-2113.
5. Дроздова М.С. Лимфопролиферативный синдром у детей с заболеваниями верхних дыхательных путей (этиология, патогенез, клиническая и лабораторная диагностика): Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – СПб., 2010. – 52 с.
6. Иванова В.В., Камальдинова Э.Г., Левина А.С. Инфекционный мононуклеоз: тактика терапии больных с негладким течением заболевания. – СПб., 2004. – 24 с.
7. Инфекционный мононуклеоз. Клиника, диагностика, современные принципы лечения / Краснов В.В., Шиленок А.И., Кузенкова Л.А., Кубышева Н.И. – СПб., Н. Новгород, 2003 – 44 с.
8. Пархоменко В.П., Виноградов А.Ф. Фазовая динамика клинической картины и адекватная терапия инфекционного мононуклеоза у детей дошкольного возраста // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2006. – №1. – С. 53-56.
9. Савенкова М.С. Хламидийная и микоплазменная инфекции в практике педиатра // Consilium Medicum. – 2005. – №1. – С. 10-17.
10. Белова Е.В. Клинико-эпидемиологические аспекты хламидийного инфицирования верхнего отдела респираторного тракта у детей: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Красноярска, 2008. – 24 с.

ПОСТУПИЛА: 12.10.2010



УДК 616.71-006.04:615-032.277.3:612.1-053.2

Козель Ю.Ю., Качесова П.С., Горошинская И.А., Сиденко Л.Ю.,  
Нескубина И.А., Ушакова Н.Д., Нестерова Ю.А., Кузнецов С.А.

## ВЛИЯНИЕ АУТОПЛАЗМОХИМИОТЕРАПИИ С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ДЕТОКСИКАЦИЕЙ АУТОПЛАЗМЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У ДЕТЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ

ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»  
Минздравсоцразвития России  
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63. E-mail: loronco.k-l@mail.ru

Цель: изучение токсичности многокурсовой химиотерапии на аутоплазме, получаемой путем дискретного аппаратного мембранного плазмафереза, проводимой детям со злокачественными опухолями костей.

Материалы и методы: в исследование было включено 20 пациентов в возрасте от 8 до 20 лет с остеосаркомой и саркомой Юинга.

Результаты: высокодозная многокурсовая аутоплазмохимиотерапия не нарушает функциональной активности основного транспортного белка плазмы крови.

Выводы: многокурсовая высокодозная аутоплазмохимиотерапия, проводимая на плазме, после её предварительной экстракорпоральной детоксикации методом дискретного аппаратного мембранного плазмафереза у детей, больных остеосаркомой и саркомой Юинга, не вызывает блокады детоксикационных систем организма, способствуя нормализации изученных показателей эндогенной интоксикации.

Ключевые слова: аутоплазмохимиотерапия, эндогенная интоксикация, опухоли костей, дети.

Yu.Yu.Kozel, P.S.Kachesova, I.A.Goroshinskaya, L.Yu.Sidenko, I.A.Neskubina,  
N.D.Ushakova, Yu.A.Nesterova, S.A.Kuznetsov

## INFLUENCE OF AUTOPLASMOCHEMOTHERAPY WITH PRELIMINARY EXTRACORPORAL DETOXICATION OF AUTOPLASMA ON PARAMETERS OF ENDOGENIC INTOXICATION IN CHILDREN WITH MALIGNANT BONE TUMOURS

Federal State Institution "Rostov Cancer Research Institute"  
Ministry of Health and Social Development of Russia  
63, 14 Line, Rostov-on-Don, 344037, Russia. E-mail: loronco.k-l@mail.ru

Purpose: To study toxicity of multi-course chemotherapy on autoplasm obtained by discreet hardware membrane plasmopheresis performed to children with malignant bone tumours.

Materials and Methods: 20 patients at the age of 8-20 years with osteosarcoma and Ewing's sarcoma.

Results: High-dose multi-course autoplasmochemotherapy does not violate functional activity of the main transport protein of blood plasma.

Summary: Multi-course high-dose autoplasmochemotherapy performed on plasma after its preliminary extracorporeal detoxication by the method of discreet hardware membrane plasmopheresis in children with osteosarcoma and Ewing's sarcoma doesn't cause blockade of the body detoxication systems, contributing to normalization of the studied parameters of endogenous intoxication.

Keywords: Autoplasmachemotherapy, endogenous intoxication, bone tumors, children.



## Введение

В общей структуре детской онкопатологии на долю злокачественных опухолей костей приходится до 10% случаев. При этом 65-75% детей и подростков, поступающих для первичного лечения, имеют III-IV стадию заболевания с местнораспространенной и генерализованной формой процесса [1]. Одним из основных методов комплексного лечения местнораспространенной и генерализованной форм злокачественных опухолей костей является многокурсовая химиотерапия. Однако схемы современной противоопухолевой терапии у детей являются дозоинтенсивными, достаточно агрессивными программами лечения, сопровождающимися миелодепрессивными реакциями, развитием вторичной иммунной недостаточности [2]. Помимо этого, проведение химиотерапии усугубляет уже имеющийся у онкологических больных эндотоксикоз [3]. По мнению ряда авторов, эндотоксикоз является одним из основополагающих факторов развития полиорганной и полисистемной недостаточности, определяя, в конечном итоге, исход заболевания [4]. Сказанное выше обуславливает необходимость разработки новых щадящих методик введения цитостатиков.

Нами был применен метод аутоплазмохимиотерапии (АПХТ), основанный на использовании в качестве растворителя цитостатиков аутоплазмы. Согласно клиническим исследованиям, метод АПХТ позволяет снизить токсичность и повысить эффективность химиотерапии [5,6]. К лечебным мероприятиям, направленным на устранение эндотоксикоза, относят эфферентную детоксикацию – удаление токсических факторов без напряжения физиологических систем организма, ответственных за элиминацию токсинов. Поэтому аутоплазму подвергали предварительной экстракорпоральной детоксикации путём плазмафереза, который является эффективным методом эфферентной детоксикации [7].

Цель и задачи данной работы – изучение токсичности многокурсовой химиотерапии на аутоплазме, получаемой путем дискретного аппаратного мембранного плазмафереза, проводимой детям со злокачественными опухолями костей. Для этого было исследовано влияние предложенного лечения на некоторые детоксикационные системы организма детей.

## Материалы и методы

В исследование было включено 20 пациентов в возрасте от 8 до 20 лет (средний возраст – 14,3 года), с остеосаркомой (12 человека) и саркомой Юинга (8 человек) IIВ-IVВ стадии процесса. Первым этапом проводился плазмаферез. Объём забираемой плазмы у детей составил 10% от объёма общей циркулирующей плазмы. Затем во флакон с аутоплазмой вводили химиопрепарат. Флакон инкубировали в термостате в течение 30 минут при температуре 37,0 С. Во время инкубации пациенту проводили инфузионную терапию глюкозо-солевыми растворами с целью поддержания осмотического давления. Схемы и дозировки вводимого цитостатика соответствовали программным рекомендациям и рассчитывались на метр тела больного. Химиотерапевтическое лечение остеогенной саркомы проводилось по схеме АР, включающую в себя введение адриамицина (доксорубицина) в дозе 30 мг/м<sup>2</sup> в 1, 2, 3 день и введение цисплатина в дозе 100 мг/м<sup>2</sup> в 4 день и альтернирующих курсов по схеме: этопозид 100мг/м<sup>2</sup>

1-5 дни, ифосфамид 1,8 г/м<sup>2</sup> 1-5 дни и этопозид 100 мг/м<sup>2</sup> 1-5 дни; циклофосфан 400 мг/м<sup>2</sup> 1-5 дни; карбоплатин 500 мг/м<sup>2</sup> в 4-й день. Вариант консолидирующей АПХТ выбирали с учетом степени лекарственного патоморфоза. Лечение саркомы Юинга проводили по следующей программе: все пациенты получали 10 курсов химиотерапии в альтернирующем режиме. Блок VАС: циклофосфамид 1400 мг/м<sup>2</sup> 1 и 2 день на фоне месны; доксорубицин 25 мг/м<sup>2</sup> – 1 и 2 день; винкристин 1,5 мг/м<sup>2</sup>. Блок IЕ: ифосфамид 3,0 г/м<sup>2</sup>/день 1-3 дни на фоне месны; этопозид 150 мг/м<sup>2</sup>/день 1-3 дни.

Для оценки работы детоксикационных систем организма были исследованы следующие биохимические тесты эндотоксикоза: уровень общей концентрации альбумина (ОКА) унифицированным колориметрическим методом, уровень эффективной концентрации альбумина (ЭКА) по методу С.А. Чегера в модификации Мельника И.А., Барановского П.В. (1985). Выраженность токсемии больных изучали по содержанию молекул средней массы при двух длинах волн: МСМ254нм и МСМ280нм [8]. Степень сорбции токсических лигандов (связывающая способность альбумина - ССА) оценивалась по отношению ЭКА/ОКА · 100%, что соответствует отношению свободных связей пула молекул альбумина к общему количеству его связей. Рассчитывался также коэффициент интоксикации, отражающий баланс между накоплением и связыванием токсических лигандов по формуле КИ=(МСМ254/ЭКА) · 1000 [9,10]. Перечисленные биохимические показатели определяли в плазме крови до начала многокурсовой аутоплазмохимиотерапии и на её этапах. Поскольку, основной задачей данной работы являлось изучение токсичности проводимой химиотерапии, а исследованные показатели у детей, больных остеосаркомой и саркомой Юинга, изменялись однонаправленно, мы объединили всех больных в одну группу. Группу доноров составили 11 детей и подростков без онкопатологии.

## Результаты исследования

Исходные значения ОКА у больных достоверно не отличались от значений в группе доноров. Однако на фоне нормального содержания альбумина происходило снижение ЭКА в среднем на 21% (p<0,05), а его связывающей способности – на 28% (p<0,001) по отношению к значениям в группе доноров. Повышенное содержание молекул средней массы отмечалось лишь для фракции МСМ254нм - на 45% (p<0,01), а уровень МСМ280нм находился в пределах нормы как до лечения, так и на последующих его этапах. Повышенное содержание МСМ254нм и снижение ЭКА привело к достоверному увеличению КИ более чем в 2,5 раза по отношению к донорским значениям. После проведения первого курса АПХТ отмечалась тенденция к достоверному увеличению ССА на 23% по сравнению с исходным уровнем, содержание МСМ254нм снизилось и не отличалось от донорских значений. Коэффициент интоксикации хотя и оставался на 42% (p<0,05) выше нормы, достоверно снизился по отношению к фоновым величинам на 44% (p<0,02), (табл.1).

Проведение второго курса АПХТ привело к увеличению содержания у больных ОКА на 11% (p<0,01) по отношению к донорским значениям, при этом ЭКА и ССА оставались сниженными на 15% и 16% соответственно (тенденция к достоверности). КИ повысился на 60% (p<0,02) относительно нормы, достоверно не изменяясь



по отношению к значениям после 1 курса. Резко повысилось содержание МСМ254нм по отношению к значениям после 1 курса – на 40% ( $p < 0,01$ ). Рассматриваемая фракция МСМ254нм является интегральным показателем содержания УФ-поглощающих веществ низкой и средней молекулярной массы, к которым относят соединения, образующиеся в процессе протеолиза поврежденных тканей. Можно полагать, что увеличение содержания молекул средней массы после 2 курса АПХТ связано с процессом распада опухоли и выходом его продуктов в кровь. Проведения 3-4 курсов АПХТ не привели к достоверным изменениям значений ОКА, ЭКА и ССА по отношению к значениям после 2 курса. Достоверно снизилось содержа-

ние МСМ254нм до уровня нормальных значений; коэффициент интоксикации после 3 и 4 курсов был выше нормы в среднем на 31% (тенденция к достоверности). После 9-10 курсов химиотерапии содержание МСМ254нм не отличалось от значений в группе доноров. Общая и эффективная концентрация альбумина достоверно снизилась, при этом значение, ССА осталось на прежнем уровне, а значение КИ, не отличалось от нормы. Такое изменение показателей, отражающих структурное состояние молекулы сывороточного альбумина, свидетельствуют о том, что проводимая высокодозная многокурсовая АПХТ не нарушает функциональной активности этого основного транспортного белка плазмы крови.

Таблица №1

**Динамика показателей функциональной активности альбумина и уровня молекул средней в плазме крови у детей со злокачественными заболеваниями костей в процессе проведения многокурсовой АПХТ**

Группа	ОКА г/л	ЭКАг/л	ССА%	МСМ у.ед. экс.		КИ
				254нм	280нм	
Доноры (n=11)	39,08±0,53	36,19±1,26	92,43±2,29	0,268±0,024	0,222±0,029	8,38±0,75
фон (n=20)	44,43±4,33	28,76±2,79 $p < 0,05$	66,11±4,36 $p < 0,001$	0,391±0,029 $p < 0,01$	0,241±0,022	19,42±3,2 $p < 0,01$
после 1 курса АПХТ (n=20)	38,31±2,88	30,45±2,39	81,33±4,82 $0,1 > p > 0,05$ $0,1 > p_1 > 0,05$	0,288±0,020 $p < 0,02$	0,186±0,020	10,6±0,94 $p < 0,05$ $p_1 < 0,02$
после 2 курса АПХТ (n=20)	43,38±1,09 $p < 0,01$	30,9±2,55	71,02±4,69 $0,1 > p > 0,05$	0,400±0,027 $p < 0,01$ $p_2 < 0,01$	0,196±0,012	11,95±1,43 $p < 0,02$ $0,1 > p_1 > 0,05$
после 3-4 курсов АПХТ (n=20)	43,33±3,91	33,22±4,03	79,24±4,65 $p < 0,02$	0,308±0,028 $0,1 > p_1 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	0,191±0,022	9,81±0,90 $0,1 > p > 0,05$ $p_1 < 0,05$
после 9-10 курсов АПХТ (n=20)	35,51±1,76 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,05$	25,96±1,13 $p < 0,001$ $0,1 > p_4 > 0,05$	78,72±5,93 $p < 0,05$	0,234±0,012 $p_1 < 0,02$ $0,1 > p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,05$	0,182±0,018	9,6±0,77 $p_1 < 0,05$

*Примечание.* Указаны значения  $p$  для достоверных изменений и изменений с тенденцией к достоверности ( $0,1 > p > 0,05$ );  $p$  – достоверность различий по сравнению с донорами;  $p_1$  – достоверность различий по сравнению со значениями до лечения (фон);  $p_2$  – достоверность различий по сравнению со значениями после 1-го курса;  $p_3$  – достоверность различий по сравнению со значениями после 2-го курса АПХТ;  $p_4$  – достоверность различий по сравнению со значениями после 3-4 курсов АПХТ.

### Выводы

Анализ полученных данных дает основание полагать, что многокурсовая высокодозная аутоплазмохимиотерапия, проводимая на плазме, после её предварительной экстракорпоральной детоксикации методом дискретного

аппаратного мембранного плазмофереза у детей, больных остеосаркомой и саркомой Юинга, не вызывает блокады детоксикационных систем организма, способствуя нормализации изученных показателей эндогенной интоксикации.



ЛИТЕРАТУРА

1. Моисеенко Е.И. Современная функциональная модель отделения амбулатория. Диагностика и химиотерапия злокачественных новообразований у детей. //Детская онкология. - 2002. - №3. - С.5-12.
2. Малахова М.Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме //Эфферентная терапия - 2000.- Т.6, № 4. - С. 3-14.
3. Афанасьева А.Н., Евтушенко В.А. Эндогенная интоксикация у больных раком желудка в раннем после операционном периоде //Клин. лаб. диагн. - 2005. - № 2. - С. 18-21.
4. Матвеев С.Б., Спиридонова Т.Г., Клычникова Е.В. и др. Критерии оценки эндогенной интоксикации при ожоговой травме //Клин. лаб. диагностика. - 2003. - № 10. - С. 52-53.
5. Владимирова Л.Ю. Неоадьювантная химиотерапия на естественных средах организма с применением пептида эпифиза эпиталамина в комплексном лечении местнораспространенного рака молочной железы: Автореф. ... канд. мед. наук. - Ростов-на-Дону, 2000. - 35с.
6. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Кулаков Г.П., Мекирян А.М., Щербанева О.И. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях //Клин. медицина. - 1981. - Т. LIX. - № 10. - С.38-42.
7. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей //Лаб. дело. - 1984. - № 3. - С.138-140.
8. Гуменюк Н.И. Сравнительная эффективность неогемодеза, сорбилака и реосорбилака в комплексной инфузионной дезинтоксикационной терапии //Семейна медицина. - 2004. - №2. - С. 68-72.
9. Златник Е.Ю. Роль иммунной системы в реализации эффектов химиотерапии на аутологичных жидких тканях у онкологических больных: Дис. ... докт. мед. наук. - Ростов н/Дону, 2003. - 406с.
10. Мельник И.А., Барановский П.В., Нестеренко Л.И. Новый способ оценки транспортной функции сывороточного альбумина //Лаб. дело. - 1985. - № 4. - С.202-204.

ПОСТУПИЛА: 08.10.2010







## Введение

В последнее время отмечается значительное увеличение частоты заболеваний крови у детей. При этом тромбоцитопении составляют около 20% всего количества больных с заболеваниями крови [1,2]. Успехи в лечении этой группы заболеваний связаны с современными патоморфологическими исследованиями, развитием иммунологии, других отраслей медицины [3]. Среди них важное место отводится хирургии.

До настоящего времени купировать синдром гиперспленизма, который развивается у данной категории больных, удавалось только обоснованной спленэктомией [4]. Между тем, потеря большого количества лимфоидной ткани организмом ребенка обрекало его на хроническую иммунодепрессию. Клинически это проявлялось наличием интеркуррентных заболеваний в послеоперационном периоде [5]. Исследования последних лет доказывают, что после спленэктомии снижается фагоцитарная активность лимфоцитов, иммунорезистентность, уровень иммуноглобулинов, комплемента, пропердина, Т-лимфоцитов [6].

Лишение организма единственного органа, вырабатывающего тафцин, отрицательно сказывается на функции печени, куда осуществляется венозный отток крови из селезенки. При этом нарушается биосинтез белка в гепатоцитах. Страдает также дезинтоксикационная функция печени.

В последние годы появился ряд работ о медикаментозной стимуляции определенных факторов иммунитета у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (ИТП). Однако полной компенсации функции утраченного органа никому достичь не удалось.

Цель работы: решить проблему купирования постспленэктомической иммунодепрессии у больных с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой.

## Материалы и методы

Исследованы 3 группы больных. 1-я – 98 больных с ИТП после преднизолонотерапии; 2-я – 40 после спленэктомии; 3-я – 28 после отсроченной аутооттрансплантации консервированной селезеночной ткани.

Из 98 больных с ИТП в 65% наблюдалась хроническая форма заболевания, в 35% – острая. В анамнезе у 80% больных за 3-4 недели до появления клинических признаков заболевания удавалось выявить ОРВИ. Условно-специфическими заболеваниями, предшествовавшими развитию тромбоцитопении, являются корь, ветряная оспа, коревая краснуха, эпидемический паротит, инфекционный мононуклеоз.

Практически у всех наблюдаемых нами больных при глубокой пальпации живота удавалось определить увеличенную селезенку. У 42% спленомегалия была значительной. Гематологические показатели у больных с ИТП довольно типичны: снижение количества тромбоцитов в периферической крови до  $2-4 \times 10^9$ /л при тяжелых формах заболевания, при легких формах отмечалось снижение до  $60-80 \times 10^9$ /л. Выраженная анемия отмечалась у 7,5% больных после значительных кровотечений.

Одним из основных консервативных методов лечения ИТП является преднизолонотерапия. Преднизолон назначается по стандартной схеме из расчета 2 мг/кг веса тела курсами от 1 до 4 месяцев. Несмотря на то, что после проводимого лечения отмечалось повышение количества тромбоцитов в периферической крови, у всех больных

наблюдались рецидивы в сроки от 3 до 6 месяцев. Параллельно с этим у 47% больных имело место увеличение массы тела.

При иммунологическом исследовании определялось снижение фагоцитарной активности лейкоцитов, количества иммуноглобулинов G и M, ИЗФ, Т-лимфоцитов.

Безуспешность 2-х курсов преднизолонотерапии является показанием к операции-спленэктомии. У наблюдаемых нами 40 больных спленэктомия производилась на фоне некупирующейся тромбоцитопении. Ранний послеоперационный период протекал без осложнений. Изучение камагноза производилось в сроки от 1 месяца до 7 лет после операции.

Из всех больных только 4 (8%) не предъявляли жалоб и считались практически здоровыми. Остальные 36 больных (92%) предъявляли жалобы на слабость, повышенную утомляемость, головные боли, периодические боли в животе, раздражительность, плохой сон, снижение аппетита. При иммунологическом исследовании выявлено снижение концентрации сывороточных иммуноглобулинов A, M, G, снижение количества Т- и В-лимфоцитов.

Анализируя анатомическую связь селезенки и печени можно предположить, что спленэктомия не может не сказаться отрицательно на функции печени. Отток венозной крови осуществляется в портальную вену, то есть происходит двойная фильтрация крови через селезенку и печень. После спленэктомии данный механизм нарушается. В печени синтезируются альбумины, фибриноген, тромбин. Синтез данных субстратов печени возможен только при поступлении определенного количества тафцина, синтезирующегося исключительно в селезенке.

Мы наблюдали 7 больных с постспленэктомическим гепатитом. Диагноз верифицирован на основании клинических проявлений, ОАК, определении содержания белка и белковых фракций в сыворотке крови, АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, холестерина, билирубина. Клиническими проявлениями гепатита в позднем послеоперационном периоде были периодические боли в правом подреберье, умеренная периодическая субиктеричность склер, снижение аппетита, повышенная утомляемость. Увеличение печени наблюдалось только в 3-х наблюдениях.

Таким образом, основным звеном в патогенезе ИТП является повышенная элиминация тромбоцитов в венозных синусах селезенки, что обосновывает спленэктомию при данном заболевании. Потеря селезенки при ИТП неизбежно приводит к некупирующейся иммунодепрессии. Существенную роль в патогенезе постспленэктомического синдрома играет нарушение дезинтоксикационной функции печени, что опосредованно через РЭС усугубляет иммунодепрессию. В подобной ситуации больным с ИТП вполне логичным было бы провести спленэктомию с последующей консервацией селезеночной ткани. В процессе консервации при этом денатурировались бы все морфологические компоненты, ответственные за элиминацию тромбоцитов и сохранилась бы жизнеспособная лимфоидная ткань. В последующем, после получения цитоморфологических результатов, можно было бы провести отсроченную аутооттрансплантацию консервированной селезеночной ткани с целью купирования послеоперационного гипоспленизма.

## Результаты

На кафедре разработан состав консерванта, обладающий антикоагулирующими, антигипоксическими, протеолитическими и антибактериальными свойствами. Его компоненты неагрессивны в отношении лимфоидной ткани.



Рекомендуемый состав консерванта:

Гепарин – 5000ед.

Обзидан- 1 мл

Поливинилпирролидон- 10г

Гентамицин – 80 мг

Контрикал – 10000ед.

Циклофосфан – -200мг

Физиологический раствор до 100 мл

Консервант готовится непосредственно перед спленэктомией. После операции удаленный орган декапсулируется и разделяется на фрагменты размерами 1x2x4 см и помещается в консервант в объемном соотношении 1:5.

В клинике детской хирургии разработан способ отсроченной аутотрансплантации консервированной селезеночной ткани. Оперировано 28 детей. После выполнения типичной спленэктомии выкраивалась левая нисходящая прядь большого сальника на питающей ножке. В левый латеральный угол разреза вводился конический трубчатый проводник. Вокруг проксимальной части проводника образовывалась полость из пряди сальника, сшитого в

виде дубликатуры и фиксированного к поперечной мышце живота в левом латеральном углу разреза. Дистальная часть проводника фиксировалась под кожей. Фрагменты декапсулированной селезенки помещались в консервант. Сосуд с консервированной селезеночной тканью хранился в холодильнике при  $T +2^{\circ}C$ . На 7 сутки селезеночная ткань измельчалась и вводилась шприцем в извлеченный проксимальный конец проводника в количестве 1/5 массы органа. В конце введения проводник извлекался.

Анализируя динамику количества тромбоцитов в раннем послеоперационном периоде отметим, что у всех больных, также как и при обычной спленэктомии, к 10-14 суткам количество тромбоцитов приходило к возрастной норме.

Изучение катамнеза в сроки от 3 мес. после операции. Проводилось УЗИ, при котором у всех больных четко определялся спленоид.

Как видно из таблицы 1, статистически достоверной разницы между группами здоровых и оперированных не выявлено.

Таблица 1

### Содержание Т-лимфоцитов и активных Т-клеток в отдаленном периоде после отсроченной аутотрансплантации консервированной селезеночной ткани

Группы больных	Лимфоциты		Е-РОК		РТБЛ	
	%	109\л	%	109кл\л	%	109\л
Здоровые	28,11±1,78	1,45±0,07	54,67±0,73	0,86±0,044	53,89±0,06	0,79±0,03
Аутотрансплантация	26,1±1,86	1,40±0,08	53,04±0,67	0,81±0,05	53,07±1,18	0,75±0,05

При детальном изучении катамнеза детей после отсроченной аутотрансплантации консервированной селезеночной ткани можно было считать практически здоровыми. Количество перенесенных интеркуррентных заболеваний в осенне-зимний период значительно не увеличилось.

### Выводы

1. Основным звеном в патогенезе ИТП является избыточная элиминация тромбоцитов в венозных синусах селезенки, что обосновывает спленэктомию при данной патологии, которая увеличивает степень иммунодепрессии, вызванную предшествовавшими курсами преднизолонотерапии. Существенную роль в патогенезе постспленэктомического синдрома играет нарушение дезинтоксикационной функции печени, что усугубляет иммунодепрессию.

2. Разработанный состав консерванта позволяет сохранить жизнеспособными структурные элементы лимфоидной ткани селезенки в течение 7 суток с режимом

консервации отдельных фрагментов декапсулированной селезенки в объемном соотношении ткани и консерванта 1:5.

3. Отсроченная аутотрансплантация консервированной селезеночной ткани позволяет получить в организме полноценную лимфоидную ткань без признаков гиперплазии и при аутотрансплантации ее в количестве 1/3–1/5 массы органа позволяет нормализовать основные иммунологические показатели к концу 1-ого месяца после операции.

4. Двухмоментная аутотрансплантация консервированной селезеночной ткани при ИТП позволяет параллельно с нормализацией количества тромбоцитов в периферической крови купировать явления постспленэктомической иммунодепрессии и избежать инвалидизации детей.

5. Разработанный лечебный комплекс, включающий спленэктомию с последующей аутотрансплантацией селезеночной ткани, технически прост, не требует дорогостоящего оборудования и медикаментов и может быть применен в практическом здравоохранении при лечении ИТП у детей.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Цымбал И.Н. Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура у детей //Лечачий врач. – 2000. - №2. – С.38-42
2. Донюш Е.К. Современное состояние вопроса об идиопатической тромбоцитопенической пурпуре у детей //Педиатрия. – 1999. - №2. – С.56-57
3. Платуха Т.Г., Петров В.Ю., Сосков Г.И., Агеенкова Э.В. Современные представления о патофизиологии и терапии идиопатической тромбоцитопенической пурпуры //Педиатрия. – 2009. - №4. – С.125-134.
4. Кондурцев В.А., Давидкин И.Л., Куртов И.В., Степанова Т.Ю. Эффективность спленэктомии и терапии преднизолоном больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой //Казанский медицинский журнал. – 2010. - №2. - С.137-142.
5. Яценко Е.А., Поддубный И.В., Донюш Е.К. Качество жизни детей с гематологическими заболеваниями после лапароскопической спленэктомии //Хирургия. – 2007. - №7. - С.41-44.
6. Кондурцев В.А., Давидкин И.Л., Куртов И.В. Состояние иммунитета у больных с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой в отдаленном периоде после спленэктомии // Клиническая медицина. – 2009. - №11. - С.59-62.



Зотова В.В.<sup>1</sup>, Селезнева О.С.<sup>1</sup>, Асланян К.С.<sup>1</sup>, Васильева Е.В.<sup>1</sup>, Мационис А.Э.<sup>2</sup>,  
Миханошина Н.А.<sup>2</sup>

## ПЕРВИЧНАЯ КОЖНАЯ Т-КЛЕТОЧНАЯ ЛИМФОМА У РЕБЕНКА 3-Х МЕСЯЦЕВ

<sup>1</sup>ГУЗ «Областная детская больница»

Россия, 344015, г. Ростов-на-Дону, ул. 339 Стрелковой дивизии, 14. E-mail: vvezotova@mail.ru

<sup>2</sup>ГУЗ «Ростовское областное патологоанатомическое бюро»

Россия, 344085, г. Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, 170

Первичные Т-клеточные лимфомы кожи встречаются у детей со злокачественными образованиями в 10-15%. Данное заболевание обусловлено злокачественной пролиферацией Т-лимфоцитов в коже. Диагностика основана на выявлении опухолевых клеток гистологическими, гистохимическими и иммунологическими методами. Мы описываем клинический случай первичной Т-клеточной лимфомы у 3-х месячного ребенка.

**Ключевые слова:** Т-клеточная лимфома, диагностика онкогематологических заболеваний у детей, дифференциальный диагноз, педиатрия.

Zotova V.V.<sup>1</sup>, Selezneva J.S.<sup>1</sup>, Aslanjan K.S.<sup>1</sup>, Vasiljeva E.V.<sup>1</sup>, Machionis A.E.<sup>2</sup>,  
Mihanoshina N.A.<sup>2</sup>

## PRIMARY T-CELL CUTANEUS LYMPHOMA AT THREE-MONTH-OLD CHILD

<sup>1</sup>State Health Care Institution «Regional Children's Hospital»

14, 339 Strelkovoy Divisyi st., Rostov-on-Don, 344085, Russia. E-mail: vvezotova@mail.ru

<sup>2</sup>State Health Care Institution «Rostov Regional Pathologicoanatomic Bureau»

170 Blagodatnaya st., Rostov-on-Don, 344085, Russia

Primary T-cell cutaneous lymphoma presents in 10-15% of children with malignant tumour. This disease is results of the neoplastic proliferation T-lymphocytes in skin. Diagnostics has based on the histology, immunology and immunohistochemistry methods. We describe a clinical case of three-month-old child with Primary T-cell cutaneous lymphoma of skin.

**Keywords:** T-cell cutaneous lymphoma, diagnostics of the oncohematological diseases., differential diagnostics, pediatrics.

**Н**еходжкинские лимфомы (НХЛ) составляют 5-8% злокачественных опухолей в детском возрасте [1]. В последние годы отмечается рост заболеваемости НХЛ у детей. Наиболее часто у детей встречаются В-клеточные лимфомы (лимфома Беркита, лимфобластные лимфомы, диффузная В-крупноклеточная лимфома) [2]. Группа Т-клеточных лимфом кожи весьма немногочисленна и представлена первичной кожной АККЛ, подкожной панникулитоподобной Т-клеточной лимфомой, лимфоматоидным папулезом, грибовидным микозом [3; 4]. По результатам многочисленных исследований [5], частота диагностирования первичной Т-клеточной кожной лимфомы варьирует от 1,5% до 18,5% в разных странах мира. Из факторов, предрасполагающих к развитию НХЛ у детей, выделяют инфицирование вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) и ВИЧ, первичные иммунодефициты (агаммаглобулинемия, селективный дефицит IgM, IgG, синдром Блума, Чедиака-Хигаси, Вискотта-Олдрича, атаксия-телеангиэктазия), предшествующая иммуносупрессивная терапия, иони-

зирующее излучение [6]. По данным литературы медиана возраста у детей с Т-лимфомами составляет 10 лет, но известны случаи Т-лимфомы у 2х летнего ребенка [7]. В связи с вышеизложенным мы приводим клинический случай диагностики первичной Т-клеточной кожной лимфомы у ребенка 3х месяцев.

Девочка К. 3х месяцев поступила в грудное отделение Областной детской больницы с жалобами на высыпания по всей поверхности кожи, периодические подъемы температуры тела до фебрильных цифр, затруднение носового дыхания. По словам родителей, девочка больна с рождения. С рождения у девочки отмечается синюшное пятно в области левой щеки. Через месяц появились новые элементы в области волосистой части головы. В возрасте 2,5 месяцев очаги в области паховых складок, идентичные очагу, который появился при рождении. По месту жительства ребенок наблюдался у участкового педиатра с диагнозом атопический дерматит. Родители ребенка стали отмечать подъемы температуры тела до фебрильных цифр, снижение аппетита, сонливость, в связи с чем



девочка была госпитализирована в детскую городскую больницу г. Волгодонска, где находилась на стационарном лечении с диагнозом: Вирусно-бактериальная инфекция. Атопический дерматит. ЦМВИ? В связи с отсутствием улучшения состояния на фоне проводимой терапии ребенок был направлен на обследование в Областную детскую больницу.

Из анамнеза известно, что ребенок родился от 2-й беременности, протекавшей на фоне ФПН с развитием внутриутробной гипоксии плода, вторых срочных родов на 41 неделе путем кесарева сечения. Вес при рождении 4160 гр.

При поступлении в отделение ОДБ состояние девочки расценено как тяжелое за счет распространенного кожного процесса, симптомов интоксикации. При осмотре отмечались катаральные явления, выраженная отечность век. На голове в области сагитального шва выявлялось образование размером 1,0x1,0x1,2 см, плотной консистенции. На туловище единичные элементы сыпи синюшного цвета разных размеров, на нижних конечностях сливная синюшно-багровая сыпь, плотная, возвышающаяся над поверхностью кожи. Периферические лимфатические узлы мелкие, подвижные. В легких жесткое дыхание. Тоны сердца ритмичные, систолический шум на верхушке. Живот мягкий, безболезненный. Печень +1,5 см, селезенка не увеличена. Стул и диурез в норме.

Учитывая данные осмотра и анамнеза, дифференциальная диагностика проводилась между такими заболеваниями как гистиоцитоз X, системный васкулит, внутриутробная инфекция.

В отделении при обследовании ребенка в общем анализе крови выявлена гипохромная анемия, относительный лимфоцитоз. В биохимическом анализе отмечались гипопропротеинемия и повышение уровня трансаминаз (ALT, AST), остальные биохимические показатели в пределах возрастной нормы. На рентгенограмме черепа в двух проекциях дефекта костей свода черепа не выявлено. На РКТ головного мозга очагов патологической плотности в веществе головного мозга не выявлено. Турецкое седло не изменено. Внутренние слуховые проходы не расширены,

симметричны. Структура костей свода и основания черепа не изменена; большой родничок открыт, черепные швы прослеживаются.

При исследовании иммунного статуса выявлена иммунная недостаточность по Т-клеточному иммунитету, нарушение дифференцировки регуляторных лимфоцитов в сторону увеличения CD4+ лимфоцитов до 66%. CD3+ лимфоциты представлены зрелыми TCR $\alpha$ / $\beta$ + клетками. В гуморальном звене отмечалась гиперIgM-глобулинемия. При ИФА диагностике выявлены IgM антитела к ЦМВ в высоком титре. В связи с чем к проводимой терапии (инфузионная, антибактериальная, заместительная (альбумин, СЗП) была подключена противовирусная терапия (ацикловир(зовиракс) и интерферон- $\alpha$ ). После стабилизации состояния ребенка была проведена операция по удалению опухоли мягких тканей теменной области, биопсия надкостницы.

При гистологическом исследовании ткани опухоли: микроскопически – в коже в дерме, гиподерме и подкожной жировой клетчатке диффузная инфильтрация опухолевыми клетками средних размеров с округлыми ядрами, четкими ядрышками; очаговые некрозы, очаговая инфильтрация макрофагами, эозинофилами, сегментоядерными лейкоцитами (рис.1).

При иммуногистохимическом исследовании в клетках опухоли выявлено: Vimentin – положительно, CD30 – отрицательно, CD3 – положительно, CD1a – отрицательно, CD31 – положительно в большинстве клеток, LCA – положительно в большинстве клеток, CD117 – отрицательно, CD4 – положительно в большинстве клеток, CD56 – отрицательно, CD20 – отрицательно, TDT – отрицательно, CD79a – отрицательно, S-100 – отрицательно, Alfa-1 antitr – положительно в значительном числе клеток, Alfa antichemotr – положительно в значительном числе клеток, Plap – отрицательно. PanCyto – положительно в эпителии, CD68 – положительно в части клеток, под эпидермисом, CD34 – положительно в сосудах, CD1a – положительно в клетках Лангерганса в эпидермисе, Act1A4 – положительно в сосудах.

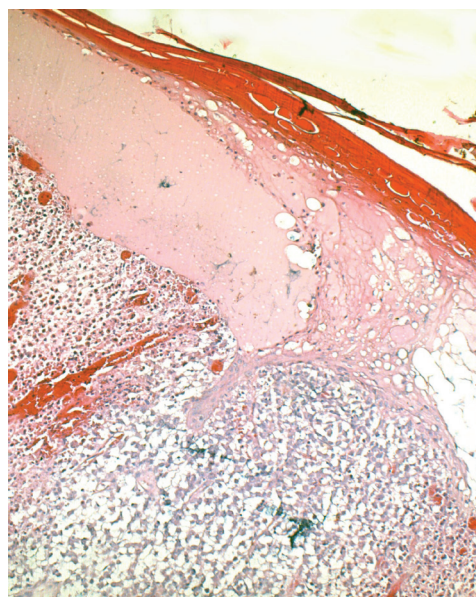
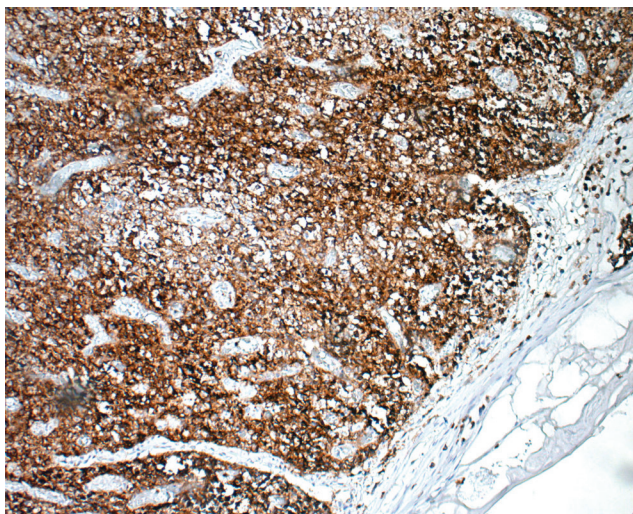
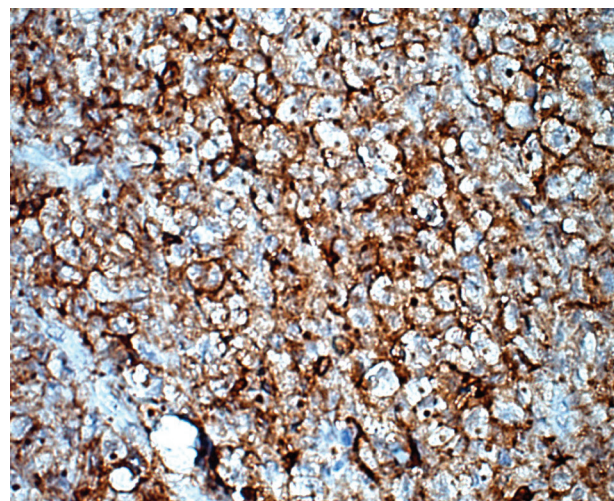


Рис. 1. Опухоль мягких тканей теменной области головы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 100х

Рис. 2. CD4<sup>+</sup>- лимфоциты в ткани опухоли.Рис.3. LCA<sup>+</sup>-клетки в ткани опухоли. Ув.400х

Заключение: Иммунофенотип первичной кожной Т-клеточной неспецифической лимфомы CD4+, LCA+, CD3+, CD31+ (рис. 2-3).

После получения заключения иммуногистохимии ребенок был переведен в отделение онко-гематологии. При исследовании стерильного пунктата было выявлено 74,6% бластных клеток, морфологически сходных с лимфобластами. Бластные клетки, в основном, крупные и средние. Цитоплазма обильная, разной степени базофилии, ядра разнообразной формы. При цитохимии пероксидаза, липиды и гликоген – отрицательно, гликоген мелкогранулярный в 34%. При иммунофенотипировании

костного мозга выявлен Т-клеточный фенотип бластных клеток (CD3+, TCR α/β, CD4+8+).

Учитывая данные обследования, был поставлен диагноз: первичная Т-клеточная неспецифическая лимфома кожи, IV стадия с поражением костного мозга. Родители ребенка от предложенного программного лечения для не В-клеточных НХЛ отказались, девочка была выписана из отделения в ЦРБ по месту жительства. В настоящий момент известно, что ребенок умер дома через неделю после выписки из онко-гематологического отделения ОДБ. Патологоанатомического исследования не проводилось.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по детской онкологии //Под ред. Л.А. Дурнова. – М.: Миклош, 2003. – 503с.
2. Harris N.L., Jaffe E.S., Dejbald J. et al. The World Health Organization of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues //Ann. Oncol. – 1999. – Vol. 10. – P. 1419-1432.
3. Wierink P., Goldman S., Dutcher S. Neoplastic disease of the blood. – Cambridge, P. 2003.-1176.
4. Jun Hee Yim, M.D.\*, Mi-Yeon Kim, M.D.\*, Hyung Ok Kim, M.D.\*, and Young Min Park, M.D.\* Subcutaneous Panniculitis – like T-cell lymphoma in a 26-Month-old child with a review of the Literature //Pediatric Dermatology. - 2006. – Vol.23, Issue 6. - P. 537-540.
5. Shukla N., Trippett T. Non-Hodgkin's lymphoma in children and adolescents //Curr. Oncol. Rep. – 2006. – Vol.8, No.5. – P. 387-394.
6. Jaffe E. Mature T-cell and NK-cell lymphomas in the pediatric age group //Am. J. Clin. Patol. – 2004. – Vol.12. – P. 110-121.
7. Валиев Т.Т. Диагностика неходжкинских лимфом у детей: современный взгляд на проблему //Детская онкология – 2008. - №1. – С.22-35.

ПОСТУПИЛО: 08.10.2010



УДК 616.993.161.

Лазарев В.В., Албегова Б.З., Гамиева Е.В., Гуссоева И.Г.

## СЛУЧАЙ ВИСЦЕРАЛЬНОГО ЛЕЙШМАНИОЗА У РЕБЕНКА, ПРОЖИВАЮЩЕГО В СЕВЕРНОЙ ОСЕТИИ

*Северо-Осетинская государственная медицинская академия, кафедра детских инфекционных болезней с пропедевтикой детских болезней,*

*РСО-Алания, 362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская 40. E-mail: lazarev-rso@yandex.ru*

В работе приведен случай висцерального лейшманиоза у ребенка раннего возраста с развитием тяжелой анемии и гепатоспленомегалии. Показаны диагностические трудности, с которыми столкнулись практические врачи при постановке диагноза лейшманиоза, не характерного для данного региона страны. Приведенный клинический пример убедительно доказывает необходимость своевременного проведения исследования аспирата костного мозга для диагностики лейшманиоза с висцеральными поражениями у детей раннего возраста.

*Ключевые слова:* висцеральный лейшманиоз, дети

Lazarev V.V., Albegova B.Z., Gamieva E.V., Gussoeva I.G.

## A CASE OF VISCERAL LEISHMANIASIS AT THE CHILD FROM NORTH OSETIA

*North Osetia State Medical Academy, Department of Children Infectious Diseases with Propedeutics of Children Diseases*

*40 Pushkinskaya st., Vladikavkaz, 362019, North Osetia Republic – Alaniya, Russia.*

*E-mail: lazarev-rso@yandex.ru*

In work the case of visceral leishmaniasis at the child of early age with development of a getere anemia and hepatosplenomegalia is given. Diagnostic difficulties which practical doctors have faced with non-typical for this region leishmaniasis are shown. This clinical example convincingly proves necessity of well-timed research of marrow aspirate for diagnostics leishmaniasis with visceral defeats at children of early age.

*Keywords:* Visceral leishmaniasis, children

Лейшманиоз — острое и хроническое заболевание человека и животных, вызывается паразитами класса жгутиковых — лейшманиями, относится к зоонозам с природной очаговостью в странах с тропическим климатом, а также в Средней Азии, Казахстане и Закавказье. В связи с интенсивной миграцией населения, большим количеством туристических поездок в эти регионы возникает вероятность возникновения данного заболевания в эндемичных по лейшманиозу местностях [1].

Источником инфекции являются собаки, шакалы, лисы, грызуны, а также человек, больной лейшманиозом. Передача инфекции осуществляется москитами, заражение происходит во время укуса. Восприимчивость высокая. При висцеральной форме лейшмании размножаются в макрофагах кожи, а затем мононуклеарными фагоцитами разносятся по всей ретикулоэндотелиальной системе, что сопровождается увеличением паренхиматозных органов, особенно селезенки, дистрофическими и некротическими процессами в них [2].

У детей лейшманиоз может проявляться тремя клиническими формами: висцеральной, кожной и кожно-слизистой. Каждая форма имеет своеобразную клиническую симптоматику [3] и может характеризоваться как острым, так и хроническим течением [4].

Острое развитие симптома комплекса лейшманиоза характерно преимущественно для детей раннего возраста.

При этом выделяют три периода заболевания: инкубационный, продромальный, развернутых клинических проявлений — токсико-анемический, терминальный. Продолжительность инкубационного периода колеблется от нескольких недель до месяцев. Продромальный период, составляющий 1-1,5 недели, характеризуется различными клиническими проявлениями интоксикационного синдрома. В период разгара заболевания у детей отмечается фебрильная лихорадка постоянного или интермиттирующего характера; прогрессирующая гепатоспленомегалия и дистрофия; анемический синдром; генерализованная лимфоаденопатия [5]. При отсутствии специфической терапии развиваются такие осложнения, как септицемия, гастроэнтерит, которые нередко приводят к летальному исходу [6]. Специфическая профилактика не разработана [7].

Хроническое течение висцеральной формы лейшманиоза чаще отмечается у детей более старшего возраста. Начало заболевания постепенное, проявляется общей слабостью, утомляемостью, бледностью кожных покровов. Лихорадка длительная, нередко волнообразная, когда подъемы температуры сменяются периодами ремиссии от нескольких дней до нескольких месяцев. Прогрессивно увеличиваются печень и селезенка, периферические лимфоузлы. Кожа становится сухой, шершавой, с участками темного цвета. На стопах появляются отеки, на лице — пастозность. В полости рта нередко возникают язвенно-не-



кротические изменения слизистой оболочки. Несмотря на хороший аппетит, больные худеют и истощаются вплоть до кахексии.

При остром и хроническом вариантах течения лейшманиоза в периферической крови регистрируется панцитопения с относительным лимфоцитозом и моноцитозом, повышенная СОЭ.

Учитывая сходство клинико-лабораторных проявлений лейшманиоз у детей следует прежде всего дифференцировать с миело- и лимфопролиферативными заболеваниями, сепсисом, циррозом печени, малярией, брюшным тифом, туберкулезом, синдромом инфекционного мононуклеоза и т.д. [1].

При постановке клинического диагноза указанные выше основные симптомы заболевания являются опорными. Следует учитывать эпидемиологические данные. Окончательный и достоверный диагноз висцерального лейшманиоза ставится на основании обнаружения возбудителя в пунктате костного мозга [5]. Полученный при пункции костный мозг помещают на предметное стекло и, осторожно размазывая тонким слоем с помощью шлифованного стекла, готовят мазок. При значительной примеси крови в пунктате на стекле находят маленькие белые комочки и готовят из них мазки. Мазок сушат на воздухе, фиксируют 30 мин в абсолютном этиловом спирте или 5 мин в метаноле (метиловом спирте), снова высушивают на воздухе. Фиксированные мазки можно хранить до окраски несколько дней.

Окраска мазка. Стекла укладывают мазками кверху на стеклянные палочки в фото кювете. На всю поверхность мазка наливают разведенную в фосфатном буфере (рН 6,9–7,1) краску Романовского на 30–50 мин. Продолжительность окраски зависит от температуры помещения – в теплом продолжительность меньше, в холодном – больше. После окраски препарат ополаскивают дистиллированной водой (или кипяченой) и высушивают. Исследуют под иммерсией [5].

Оценка результатов. В разгаре болезни лейшманиоз могут обнаруживаться легко. Обнаружение возбудителя лейшманиоза в мазках костного мозга в ряде случаев затруднено в виду возможного их расположения как внутри клеток, так и вне. Последнее обусловлено лизисом клеток при фиксации мазков на стекле. Обычно этому сопутствует обнаружение теней Боткина-Гумпрехта, что наталкивает клинициста, прежде всего, на предположение о синдроме инфекционного мононуклеоза или лимфопролиферативного заболевания. Для повышения эффективности визуализации возбудителей лейшманиоза в мазках костного мозга необходимо оценить не менее 500 полей зрения [6].

Синдром гепатоспленомегалии и анемии в сочетании с лихорадкой в клинике детских болезней представляет определенные трудности как в проведении многочисленных, а порой и многократных исследований, так и в трактовке полученных результатов.

Представляем собственное наблюдение за мальчиком 3 лет с гепатоспленомегалией, анемией и фебрильной лихорадкой. Ребенок постоянно проживал в Южной Осетии, в г. Цхинвали, в регионе эндемичном по лейшманиозу. Мальчик поступил в РДКБ г. Владикавказ через месяц от начала заболевания с жалобами матери на общую слабость, повышение температуры тела у ребенка до 39–40,2°C.

Состояние тяжелое. Симптомы интоксикации выражены, аппетит снижен, вял. Правильного телосложения, пониженного питания, кожные покровы бледные, чистые.

Склеры обычной окраски. Тургор тканей снижен. Периферические лимфоузлы шейные и подчелюстные I порядка, единичные, подвижные, эластичные, безболезненные.

Костно-мышечная система без видимой патологии. Большой родничок закрыт. Носовое дыхание свободное. Зев розовый, миндалины чистые.

Грудная клетка цилиндрической формы, одышки нет. Перкуторный звук легочный. Над легкими дыхание пуэрильное.

Область сердца не изменена. Границы относительной сердечной тупости в пределах нормы. Тоны приглушены, ритм правильный. Нежный систолический шум на верхушке. Слизистые рта чистые, влажные, живот мягкий, при пальпации безболезненный. Симптомы раздражения брюшины отрицательные, печень пальпируется на уровне пупка, край эластичный, умерено плотный, поверхность гладкая, безболезненная при пальпации. Селезенка выступает из-под края реберной дуги на 6 см, умеренно плотная, край безболезненный. Стул оформлен, желтого цвета, 1 раз в сутки.

Мочепускание безболезненное, нормальное, моча прозрачная. Отеки отсутствуют. Щитовидная железа не увеличена, наружные половые органы по мужскому типу сформированы правильно.

Сознание ясное. Нервно-психическое развитие соответствует возрасту. Менингеальных симптомов нет.

Данные параклинических исследований. Общий анализ крови: эр.- 2,83 x 10<sup>12</sup>/л; Нв-73 г/л; Нт-21; L-4,8 x 10<sup>9</sup>/л; п/я-11%, э-0%, с/я-4%, м-5%, л-80%, Тр. 28x10<sup>9</sup>/л, миел.-1%, юн.-2%, ретик.-15%, СОЭ- 56 мм/ч.

Многочисленные посевы крови, мочи, ЦСЖ, микроскопия толстой капли крови на менингококк, малярию, кровь на лептоспироз, ПЦР исследования ЦСЖ на герпетическую, хламидийную инфекцию, токсоплазму, ЦМВ, ВЭБ были с отрицательными результатами.

Для исключения первичного заболевания кроветворной системы ребенку была проведена инцизионная биопсия костного мозга. По данным миелограммы выявлены: увеличение относительного содержания палочкоядерных нейтрофилов до 31,2%, признаки раздражения эритрона с нормобластическим типом кроветворения, угнетение мегакариопоэза.

Врачом, проводившим цитологическое исследование мазков костного мозга, лейшманиоз не был выявлен. Однако, по настоянию клиницистов, препараты были пересмотрены специалистами института паразитологии и тропической медицины г. Москвы, которые обнаружили единичные и скопления лейшманиоза в гемопоэтических клетках костного мозга.

В результате проведенных исследований был верифицирован диагноз висцерального лейшманиоза. Проведено лечение глукантином, состояние ребенка хорошее, находится на диспансерном наблюдении по месту жительства.

Диагностика висцерального лейшманиоза у этого ребенка была трудной, так как данное заболевание не типично для России, многие годы не регистрировалось в нашем регионе. Как видно из приведенного клинического примера, данная нозологическая форма, в связи с широкой миграцией населения, представляет актуальность не только в районах природной очаговости, но и на территории средней полосы и Юга России. Данный случай наглядно демонстрирует возможность встречи педиатров, инфекционистов с редкими инфекциями и необходимость готовности врачей-лаборантов оказать им помощь в правильной постановке диагноза.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Шамшева О.В. Инфекционные болезни и вакцинопрофилактика у детей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 687 с.
2. Rukunuzzaman M. Rahman M.E. Epidemiological study of risk factors related to childhood visceral leishmaniasis // Mymensingh Med J. - 2008. - V.17 (1). - P. 46-51.
3. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects/ M. M. Lessa et al. //Rev. Bras. Otorrinolaringol. (Engl. Ed).— 2007. - V. 73 (6). - P. 843-847.
4. Gangneus J. P. Recurrent American cutaneous leishmaniasis / J. P. Ga'ng- neus, S. Sauzet, S. Donnard // Emerg. Infect. Dis. — 2007.— V. 13 (1)--P. 1436-1438.
5. Тропические болезни: Учебник / Под ред. Е. П. Шуваловой. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2004. - 703 с.
6. Palit P. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against Leishmania donovani //J. Antimi crob. Chemother. - 2008. - V. 1 3. - P. 235-238.
7. Palatnik-de-Sousa C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years // Vaccine. - 2008. - V. 30. - P. 467-468

ПОСТУПИЛА: 10.10.2010





Козель Ю.Ю., Кузнецов С.А.

## РАК НОСОГЛОТКИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ: ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ В ОТДЕЛЕНИИ ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ РНИОИ

ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»

Минздравсоцразвития России, отделение детской онкологии.

Россия, 344033, г. Ростов-на-Дону, ул.14 линия 63, тел. (863) 250-2971

Рак носоглотки относительно редкое заболевание для детского возраста. Поэтому результаты лечения детей с данным заболеванием недостаточно освещены в литературе. Нами проведен анализ результатов лечения детей с раком носоглотки, наблюдавшихся в отделении детской онкологии РНИОИ. Всего в отделении детской онкологии РНИОИ наблюдалось 17 больных. В статье представлены стадийность заболевания, морфологическое распределение рака носоглотки у наблюдавшихся детей, результаты проведенного лечения при проведении определенной схемы химиолучевого лечения.

*Ключевые слова:* рак, носоглотка, химиолучевое лечение, дети.

Kozel Yu.Yu., Kuznetsov S.A.

## CANCER OF NASOPHARYNX IN CHILDREN: EXPERIENCE OF TREATMENT AT PEDIATRIC ONCOLOGY DEPARTMENT OF ROSTOV CANCER RESEARCH INSTITUTE

Federal State Institution "Rostov Cancer Research Institute"

Ministry of Health and Social Development of Russia,

Pediatric Oncology Department

63, 14 Line, Rostov-on-Don, 344037, Russia, tel. +7(863) 250-29-71

Cancer of nasopharynx is a rather rare pediatric disease. That is why the results of treatment of children with this disease presented in literature are scanty. We performed treatment analysis of children with nasopharyngeal cancer observed at Pediatric Oncology Department of Rostov Cancer Research Institute. The study includes 17 patients. The paper presents stages of the disease, morphologic distribution of nasopharyngeal cancer in the studied group, results of the performed treatment with a certain scheme of chemo-radiotherapy

*Keywords:* Cancer, nasopharynx, chemoradiotherapy, children.

**З**локачественные опухоли носоглотки у детей составляют от 1 до 3% от общего числа детей со злокачественными новообразованиями. Данная патология встречается повсеместно, однако наибольшая распространенность отмечается у жителей Юго-Восточной Азии и составляет около 10-20% всех злокачественных опухолей у детей. Анатомо-топографические особенности носоглотки предопределяют варианты клинического течения заболевания, такие как распространение опухоли в близлежащие структуры с развитием соответствующей симптоматики. Выраженная биологическая активность низкодифференцированного рака носоглотки у детей объясняет агрессивность течения с развитием как регионарных, так и отдаленных метастазов. Метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов при недифференцированном раке носоглотки отмечается более чем в 90% наблюдений с преимущественной лока-

лизациями в верхних отделах шеи. Отдаленные метастазы могут развиваться в легких, костях, мягких тканях, печени и других органах. [1] Морфологически согласно Международной гистологической классификации ВОЗ, носоглоточный рак имеет три варианта: плоскоклеточный ороговевающий, плоскоклеточный неороговевающий, недифференцированный. [2] К двум последним вариантам часто применяют термин лимфоэпителиальный рак.

Лимфоэпителиальный рак занимает основное место среди злокачественных эпителиальных опухолей носоглотки и встречается в 97% наблюдений. [2] Диагностика опухолей носоглотки на ранних стадиях развития представляет очень большие сложности. Носоглотку считают «слепой» зоной, крайне трудной для первичной диагностики, обзора и манипуляций, кроме того, часто встречающиеся воспалительные процессы в носоглотке у детей (аденоидиты, ринофарингиты) имеют сходную



симптоматику со злокачественными новообразованиями носоглотки. Так же большое количество лимфаденопатий различной этиологии с локализацией на шее приводит к еще большим трудностям в диагностике. С трудностями диагностики связывают большой процент детей, поступивших на специализированное лечение в запущенных стадиях заболевания – III-IV стадии (около 70-80%). [1] Основным методом лечения злокачественных опухолей носоглотки у детей является химиолучевая терапия. По данным доступной нам литературы выживаемость детей с раком носоглотки не превышает 30% [3] Однако из-за относительно низкой частоты встречаемости данной патологии на территории Российской Федерации схемы и результаты лечения в современной отечественной литературе освещены недостаточно.

На базе отделения детской онкологии Ростовского научно-исследовательского онкологического института за период с 2004 по 2009 год проходили лечение 17 больных по поводу рака носоглотки, что составило 4,2% случаев от всех больных детей со злокачественными опухолями, проходивших лечение в отделении детской онкологии за истекший период.

На момент поступления у 1 пациентки (5,9%) выставлена I стадия процесса, у 3 больных (17,6%) II стадия, у 11 больных (64,7%) III стадия и у 2 больных (11,7%) IV стадия. Средний срок от момента появления первых симптомов заболевания до верификации процесса составил 3 месяца, что обусловлено лечением больных по поводу хронических аденоидитов, риносинуситов, банальных лимфаденитов в различных стационарах неонкологического профиля. Средний возраст пациентов составил  $15,0 \pm 0,5$  лет.

По морфологическим вариантам опухоли разделились следующим образом: недифференцированный рак – 12 случаев (70,6%), неороговевающий плоскоклеточный рак – 4 случая (23,5%), в 1 случае (5,9%) наблюдался высококодифференцированный переходо-клеточный рак.

По клиническим признакам отмечался типичный симптомокомплекс для данной патологии: заложенность носа, конгломерат лимфатических узлов на шее. У больных с верифицированной IV стадией заболевания определялось: у одного больного местно-распространенный процесс, с прорастанием в полость черепа и поражением височной доли головного мозга, и у одного больного поражение лимфатических узлов надключичной области и средостения с метастатическим поражением головного мозга.

Схема терапии предполагала проведение 4 курсов индукционной полихимиотерапии, в последующем лучевой терапии по радикальной программе в суммарной очаговой дозе на носоглотку 60 Гр., на лимфатические узлы шеи 50 Гр и 4 курсов консолидирующей полихимиотерапии. В схему полихимиотерапии включались препараты циклофосфан в 1,8 дни в дозе  $500 \text{ мг/м}^2$ , доксорубин 30  $\text{мг/м}^2$  в 1 день, винкристин  $1,5 \text{ мг/м}^2$  в 1,8 дни, цисплатин 100  $\text{мг/м}^2$  в 4 день. Перерыв между курсами полихимиотерапии составлял 3 недели.

В результате проведенного лечения в настоящее время в ремиссии находятся 10 пациентов (58,8%). Средний срок ремиссии составляет 3 года. Exitus letalis отмечен в 5 наблюдениях (29,4%). 2 больных выбыли из-под наблюдения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дурнов Л.А., Голдобенко Г.В. Детская онкология. - М.: Медицина, 2002. – 600с.
2. Черствый Е.Д., Кравцовой Г.И., Фурманчук А.В. Опухоли и

опухолеподобные процессы у детей. - Минск: «Асар», 2002. – 399с.

3. Переводчикова Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Справочник. - М. 2005. – 700с.

ПОСТУПИЛА: 08.10.2010



Павленко В.Л., Асланян К.С., Зотова В.В., Васильева Е.В.

## ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГУЗ «ОБЛАСТНАЯ ДЕТСКАЯ БОЛЬНИЦА» Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ: 18-ЛЕТНИЙ ОПЫТ РАБОТЫ

ГУЗ «Областная детская больница»,

Россия, 344015, г. Ростов-на-Дону, ул. 339й Стрелковой дивизии, 14, E-mail: safrosha@mail.ru

В статье описан опыт работы детского онкогематологического центра, созданного 18 лет назад. Даны результаты бессобытийной выживаемости пациентов, получивших высокотехнологичное лечение согласно современным протоколам химиотерапии, а также программам с использованием альтернативных методов терапии. Представлен опыт организации психосоциальной службы и проведения реабилитации детей со злокачественными новообразованиями.

*Ключевые слова:* дети, онкогематологический центр, психосоциальная реабилитация.

Pavlenko V.L., Aslanyan K.S., Zotova V.V., Vasilieva E.V.

## CENTER OF ONCOLOGY AND HEMATOLOGY OF ROSTOV REGIONAL CHILDREN'S HOSPITAL: 18-YEARS EXPERIENCE OF WORK

State Health Care Institution «Regional Children's Hospital»

12 334 Strelkovoy Divisyi st., Rostov-on-Don, 344085, Russia. E-mail: safrosha@mail.ru

This paper presents the results of work of Children's center of oncology and hematology during 18 years. There are presented results of event free survival of patients, treated in accordance with the modern high-technological protocols of the chemotherapy and using the alternative methods of the treatment. We also present our experience of the psychosocial service organization and the rehabilitation of children with the oncology diseases.

*Keywords:* Children, center of oncology and hematology, psychosocial rehabilitation.

Детский онкогематологический центр (ДОГЦ) ГУЗ «Областная детская больница» г. Ростова-на-Дону был создан в 1992 году для лечения детей Ростовской области (РО) с онкологическими и гематологическими заболеваниями. Начиная с 1995 года в центр госпитализируются дети со злокачественными новообразованиями (ЗН) из республик, краев и областей юга России.

Диагностика, лечение, реабилитация онкозаболеваний осуществляется методом взаимодействия всех подразделений многопрофильной детской больницы с тремя, сохраняющими преемственность между собой, подразделениями ДОГЦ: стационарного отделения на 30 коек, дневного стационара на 10 коек и реанимационного отсека на 2 койки в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) (рис. 1).



Рис. 1. Структура ДОГЦ ГУЗ ОДБ



Большая часть финансирования ДОГЦ производится из бюджета РО, где отдельной строкой прописано ежегодное выделение 15-16 млн. рублей. Отчисления в пользу центра идут также из Федерального бюджета в размере 12-14 млн. рублей, из средств Фонда обязательного медицинского страхования - 4-5 млн. рублей в год. Благотворительная и спонсорская помощь ежегодно составляет около 2 млн. рублей.

Достижения терапии больных с ранее смертельными заболеваниями привели к тому, что большинство детей излечились, возвратились к активной жизни, учатся, работают и имеют здоровое потомство. С 1992 по 2009 годы пролечено 1450 детей со ЗН. Общая выживаемость по центру составила 69,63% (рис. 2).

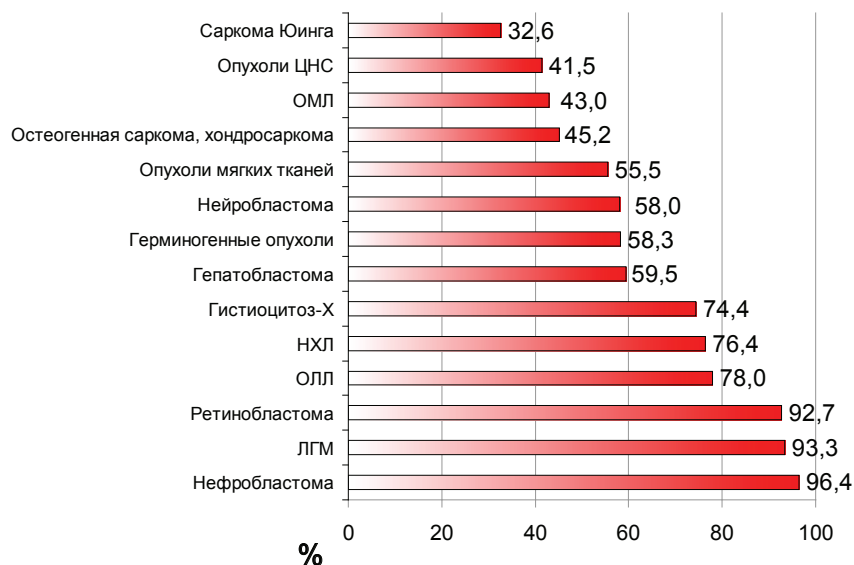


Рис. 2. 5-летняя бессобытийная выживаемость

Верификация опухолевого заболевания в ДОГЦ осуществляется с помощью цитологического и цитохимического исследования мазков костного мозга и периферической крови, мультипараметрической проточной цитофлуорометрии клеток костного мозга, гистологического, иммуногистохимического, цитогенетического и молекулярно-генетического анализа опухолевых клеток. В практике ДОГЦ используются также и визуализирующие методики, такие как рентгенологическое исследование, рентген-компьютерная и магнитно-резонансная томография, радиоизотопная и ультразвуковая диагностика.

Создание подобного лабораторно-диагностического комплекса позволило из года в год целенаправленно осваивать новые высокие технологии лечения пациентов. В ДОГЦ используются практически все современные протоколы программной полихимиотерапии (ПХТ) ЗН детского возраста («ALL-NHL-BFM 90,95», «AML-BFM-87,93», «НИИ ДОГ ОМЛ 2008», «ALL-MB 2008», «ALL-BFM 2002 REZ», «APL-2003», «DAL-HD-90», «DAL-HX-2002», «CWS», «EICESS», «COSS», «SIOP 2001», «B-NHL 2004M»), предполагающие применение высокотоксичных режимов введения цитостатических препаратов и сопроводительной терапии. ДОГЦ ГУЗ «ОДБ» г. Ростова-на-Дону участвует в четырех международных мультицентровых исследованиях лечения острого лимфобластного, острого миелобластного и острого промиелоцитарного лейкозов, В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-НХЛ) [1].

Применяемая в большинстве протоколов лечения ЗН у детей интенсивная ПХТ несет непосредственную опас-

ность развития жизнеугрожающих осложнений и появления многообразной поздней органной токсичности, снижающей качество жизни излеченных пациентов. Вышесказанное делает актуальным поиск альтернативных методов лечения, использование которых не будет сопряжено со столь тяжелой токсичностью, но позволит получать быстрый противоопухолевый эффект за счет выполнения условий интенсивного тайминга и быстрого сокращения массы опухоли. В протоколе «В-НХЛ-2004м», разработанном сотрудниками Федерального научно-клинического центра детской гематологии/онкологии и иммунологии (Москва) для лечения первичных В-НХЛ/В-ОЛЛ у детей и подростков до 18 лет на основе программы «NHL-BFM-90», использована терапия короткими курсами высокоинтенсивной ПХТ в сочетании с 4-мя введениями ритуксимаба - химерного моноклонального антитела (АТ) к CD20-антигену В-клеток. Протокол успешно используется в ДОГЦ ГУЗ «ОДБ» г. Ростова-на-Дону с 2004 года в рамках мультицентрового исследования [2].

Современные стандарты оценки результатов терапии стали предполагать не только традиционные показатели бессобытийной выживаемости, длительности ремиссий, но и определение уровня физического и психического здоровья пациентов. На всех этапах лечения является важным сохранение и улучшение качества сохраненных лет жизни и психоэмоционального статуса ребенка.

С учетом зарубежного опыта, социальных и культурных условий жизни в нашей стране и имеющихся местных ресурсов в ДОГЦ ГУЗ «ОДБ» в 1997 году была создана психосоциальная служба (табл.1).



Таблица 1

**Психосоциальная служба ДОГЦ ГУЗ ОДБ**

КОМАНДА		
2 ПСИХОЛОГА	2 ВОСПИТАТЕЛЯ	СПЕЦИАЛИСТ ПО СОЦИАЛЬНОЙ РАБОТЕ
РОДИТЕЛЬСКОЕ ОБЩЕСТВО		
РУКОВОДИТЕЛИ КРУЖКОВ ДЕТСКОГО ТВОРЧЕСТВА		
ПРЕДСТАВИТЕЛИ РЕЛИГИОЗНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ		
ВОЛОНТЕРЫ		
ШКОЛЬНЫЕ УЧИТЕЛЯ		

Целью работы психосоциальной службы является усиление возможностей ребенка и его семьи в использовании собственных резервов в кризисной ситуации. За время работы службы отмечается повышение качества жизни пациентов во время и после окончания лечения. Дети продолжают школьное обучение в индивидуальном порядке, занимаются творческой деятельностью, активно участвуют в выставках, концертах, праздниках, экскурсиях [3,4].

Кроме того, в ДОГЦ налажено сотрудничество с государственными, коммерческими и общественными организациями.

В 2007–2009 годах были проведены 3 летних реабилитационных лагеря для детей Ростовской области, страдающих ЗН. Международная концепция летних реабилитационных лагерей (РЛ) для детей-долгожителей, перенесших различные злокачественные заболевания, внедряется в практику с учетом Российской культурной и социально-бытовой среды [5].

Летние РЛ работали как развивающая социальная среда, дающая коррекционно-развивающую поддержку бывшим пациентам ДОГЦ, испытывающим многолетнюю изоляцию, семейную гиперопеку и социально-культурную дезадаптацию.

Таким образом, 18-летний опыт работы онкогематологического центра показал целесообразность его создания в многопрофильной детской больнице. Такая функциональная модель, имеющая разнонаправленную деятельность, высокоэффективна в диагностике, лечении и реабилитации детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Попа А.В., Асланян К.С. и др. Эпигенетическая терапия в лечении детей с ОМЛ //Сборник материалов 4-го съезда детских онкологов России с международным участием. – М.; 2009.- С.138.
2. Асланян К.С., Васильева Е.В. и др. Опыт использования ритуксимаба в лечении В клеточных неходжкинских лимфом у детей //Сборник материалов 4-го съезда детских онкологов России с международным участием. – М.; 2009.- С.52
3. Aralova M.P., Aslanyan K.S. et al. Disease Attitude and Self-concept of Haemophilia C Adolescents in connection with Parental Attitude //International journal of psychology. - 2009.- V.43, Issue 3/4.- P. 126.
4. Аралова М.П., Асланян К.С. Психологические аспекты качества жизни пациентов подросткового возраста с острым лимфобластным лейкозом в длительной ремиссии //Вопросы гематологии и онкологии - 2004.- Т. 3, № 3 – С. 20-22.
5. Полевиченко Е.В., Асланян К.С., Павленко В.Л. и др. Летний реабилитационный лагерь для детей с онкогематологическими заболеваниями как инновационная технология медико-социальной работы //Тезисы I конгресса федерации педиатров стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развития и питания». - Киев; 2009.- С. 7.

ПОСТУПИЛА: 07.10.2010



УДК: 614.253-053.2

**Ткаченко А.Е., Сафонова С.А., Пунанов Ю.А., Придвижкин С.И.,  
Овсянникова П.Е., Воробьева Л.А., Товпыга В.Г., Шаргородская О.А.**

## **ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТЫ ПЕРВОГО В РОССИИ ДЕТСКОГО ХОСПИСА В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**

*СПб ГАУЗ «Детский хоспис»,  
Россия, 192131, Санкт-Петербург, ул. Бабушкина, 56а. E-mail: info@kidshospis.org*

Авторы отмечают высокий уровень инвалидизации детей в Российской Федерации. Под эгидой Русской Православной церкви с 2003 года в Санкт-Петербурге работает первый в России «Детский хоспис». В статье представлены цели и задачи работы хосписа, его структура, опыт работы различных служб и подразделений. Координированная работа стационара хосписа и бригад выездной службы позволяет улучшить качество жизни детей-инвалидов.

*Ключевые слова:* дети-инвалиды, паллиативная помощь, детский хоспис.

**Tkachenko A.E., Safonova S.A., Punanov Yu.A., Pridvizhkin S.I., Ovsyanniova P.E.,  
Vorobyova L.A., Tovpyga V.G., Shargorodskaya O.A.**

## **SAINT-PETERSBURG EXPERIENCE OF THE FIRST RUSSIAN PEDIATRIC HOSPICE ORGANIZATION**

*Childrens Hospice  
56a Babushkina st., St.Petersburg, 192131, Russia. E-mail: info@kidshospis.org*

The authors of the article note the high rate of pediatric disabilities in Russia and describe the experience of Russia's first organization actively acting in the field of pediatric social care and palliation under the auspices of the Russian Orthodox Church since 2003, "Pediatric hospice". The article describe in detail the goals and functions of the pediatric hospice, its structure, actual experience of its different branches and departments. Coordinated work of inpatient department and home care teams allows increasing the quality of life of children with disabilities.

*Keywords:* disabled children, palliative care, pediatric hospice.

*Бог не обещал дней без боли,  
смеха без слез, солнца без дождя....  
Но Он обещал дать силу на  
каждый день, утешить плачущих  
и осветить путь идущим...*

**П**о сравнению с развитыми странами в России отмечается высокий уровень детской инвалидности – до 200 детей инвалидов на 10.000 детей в возрасте от 0 до 17 лет, то есть, дети-инвалиды составляют до 4,5 % от всего детского населения Российской Федерации. К сожалению, в ближайшие годы специалисты прогнозируют рост этих цифр на фоне снижения численности детского населения.

В структуре детской инвалидности лидирующие позиции занимают болезни центральной нервной системы, психические расстройства и врожденные аномалии развития, на долю которых приходится до 70 % от всех заболеваний детей-инвалидов. Далее, в порядке убывания частоты, следуют инфекционные заболевания, эндокринные нарушения и злокачественные новообразования. Частота последних составляет до 20 первичных случаев на 100.000 детского населения в год. Несмотря на то, что в

последние десятилетия достигнуты существенные успехи в лечении детей, страдающих злокачественными новообразованиями, до 30 % этих пациентов погибают от прогрессирования заболевания.

Состояние здоровья значительной части детей-инвалидов в нашей стране находится на критически низком уровне. Для улучшения качества жизни этой, довольно большой, группы детей в Санкт-Петербурге в 2003 году по инициативе Русской Православной Церкви и по благословению Высокопреосвященнейшего Владимира, Митрополита Санкт-Петербургского и Ладожского, создан первый в стране «Детский Хоспис».

В настоящее время на хосписном попечении находится более 200 пациентов. В структуре пациентов преобладают дети с детским церебральным параличом, составляющие до 50 % от всех больных. Хоспис оказывает разностороннюю помощь детям с генерализованными формами злокачественных новообразований, с генетическими болезнями, с тяжелыми последствиями травм, пациентам с хронической почечной недостаточностью. Программы оказания помощи разрабатываются индивидуально для каждого ребенка и его семьи и включают в себя медицинскую, социальную и психологическую помощь.



До 2010 года паллиативная помощь детям и их семьям оказывалась только выездными бригадами [1]. Первого июня 2010 года был открыт специально спроектированный стационар «Детского хосписа». Финансирование строительства стационара и последующее его содержание осуществляется Правительством Санкт-Петербурга. Таким образом, сегодня работа «Детского хосписа» в круглосуточном режиме осуществляется стационаром, рассчитанным на 18 коек, стационаром дневного пребывания и выездной службой.

Работа стационара проводится по графику круглосуточного сестринского и врачебного наблюдения [2]. В стационаре дневного пребывания могут одновременно находиться до 10 пациентов, которые утром доставляются из дома (на транспорте хосписа) для проведения медицинских и реабилитационных процедур, а вечером опять уезжают домой. Основная часть больных, находящихся на попечении хосписа, получает помощь бригады выездной службы. В состав бригады обычно входят врач, медицинская сестра, социальный работник, психолог, иногда священник. При необходимости к пациенту могут быть доставлены «узкие специалисты» – невролог, детский хирург, уролог и др., работающие в хосписе. Если в штате хосписа нет необходимого специалиста, то для консультации привлекаются ведущие специалисты детских стационаров Санкт-Петербурга. Врач выездной бригады проводит динамическое наблюдение за пациентом и полноценную симптоматическую терапию. Медицинская сестра выполняет назначения и рекомендации врача, проводит весь объем лечебных процедур и манипуляций, обучает родителей и родственников уходу за ребенком.

Одной из важнейших задач паллиативной помощи детям является подбор и проведение адекватной противоболевой терапии [3]. При невозможности такого подбора в домашних условиях, ребенок госпитализируется в стационар. Боль всегда сопровождается тяжелыми страданиями, физическими и душевными. Страдающий ребенок иначе воспринимает и себя, и близких и окружающий мир. Основной задачей противоболевой терапии следует считать уменьшение или полное устранение боли при сохранении сознания и интеллектуальных способностей ребенка [4].

Не менее важной, чем медицинская помощь детям-инвалидам, является психологическая и социальная помощь [5,6]. Для решения этих задач, в структуре «Детского хосписа» была организована социально-психологическая

служба. В её состав входят психологи, социальные педагоги, воспитатели, логопеды-дефектологи, специалисты по социальной работе. Данная служба осуществляет свою деятельность не только в стационаре и стационаре дневного пребывания, но и в бригадах выездной службы. При этом высококвалифицированную помощь получают не только пациенты хосписа, но и члены их семей.

Детей и их близких родственников учат эмоционально полно «проживать» каждую минуту жизни, налаживать близкие и доверительные отношения друг с другом. Работа с родственниками ребенка заключается и в проведении психологической подготовки к потере близкого члена семьи, а также в поддержке родственников после смерти ребенка. Сотрудники социально-психологической службы хосписа стараются дать возможность каждому обрести понимание и сочувствие [7].

Важнейшей миссией «Детского хосписа» как организации, созданной по инициативе Русской Православной Церкви, является пасторское душепопечение, духовная поддержка [8]. Каждый пациент и его родные могут сколь угодно часто и без ограничений во времени встречаться со священнослужителем на дому, в хосписе и вне его. Организуются посещение храмов, паломнические поездки, совершение церковных обрядов и Таинств.

Содружество родственников с медицинским психологом, социальным работником, священнослужителем и лечащим врачом позволяет обеспечить психологическое спокойствие в семье. Это также достигается удовлетворением желаний ребенка, сохранением его связей с внешним миром, поддержанием в нем интереса к жизни. Работники хосписа разрабатывают индивидуальные программы для каждого ребенка, которые учитывают выявленные в процессе общения особенности личности и физического состояния больного, семейной ситуации и социально-бытовых условий жизни. Пациенты получают возможность общения с людьми, находят новых друзей, что не дает детям и их близким «закрыться» в своей болезни.

«Детский хоспис» оказывает разностороннюю помощь не только детям жителям Санкт-Петербурга и Ленинградской области. В течение последних 3 лет осуществляется проект «Мечты сбываются», который адресован всем детям-инвалидам Российской Федерации.

Тесное сотрудничество «Детского хосписа» с НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова и Институтом детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой способствует дальнейшему развитию паллиативной помощи и улучшению качества жизни детей-инвалидов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бялик М.А., Моисеенко Е.И. Хоспис на дому, как форма организации паллиативной помощи детям с онкологическими заболеваниями // Проблемы паллиативной помощи в онкологии. – Москва, 2002. – Т.1-2. – С.10.
2. Зельницкий Л.А., Стерлева Е.П., Арбузова Г.Б. Одна из моделей организации медико-социальной помощи инкурабельным онкологическим больным в крупном городе // Проблемы паллиативной помощи в онкологии. – Москва, 2002. – Т.1-2. – С.13.
3. Foley K.M. The treatment of pain in patient with cancer // Cancer. - 1986. - V.56. - P.194-215.
4. Гнездилов А.В. Психотерапевтические аспекты в хосписной службе // Паллиативная медицина и реабилитация. - 1996. - №1. - С.30-32.
5. Гнездилов А.В., Леоненкова С.А., Репина М.Т. Некоторые социальные аспекты в хосписной службе для онкологических больных // Проблемы паллиативной помощи в онкологии. – Москва, 2002. – Т.1-2. – С.50-51.
6. Lansky S.B., List M.A., Ritter-Sterr C. Psychosocial consequences of cure // Cancer. - 1986. - V.58. - P.529-533.
7. Evans A.E. Practical care for the family of a child with cancer // Cancer. - 1975. - V.35. - P.871-875.
8. Дунаевский И.В., Беляев Д.Г. Место религии в паллиативном лечении онкологических больных // I конгресс «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении», Ялта, 1996. - С.8-9.

ПОСТУПИЛА: 17.10.2010



УДК: 616.155.392.8-07

Шатохин Ю.В., Снежко И.В., Гончарова З.А., Докучаев С.Е.,  
Фомина-Чертоусова Н.А.

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНИКУЛЯРНОГО МИЕЛОЗА

*Ростовский государственный медицинский университет  
Кафедра гематологии и трансфузиологии ФПК и ППС.*

*Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский, 29. E-mail: I. Snezhko@ mail.ru*

Цель исследования: оценка показателей периферической крови и костного мозга больных фуникулярным миелозом в сопоставлении с данными анамнеза в плане выявления причины развития миелинопатии для раннего назначения патогенетической терапии. Материалы и методы: обследовано 25 пациентов в возрасте от 42 до 79 лет с подтвержденным фуникулярным миелозом с различными возможными причинами развития миелинопатии в анамнезе.

Результаты: при оценке показателей периферической крови и костного мозга были выявлены изменения, характерные для В12-дефицитной анемии. Показано, что ранняя постановка диагноза В12 –дефицитной анемии и своевременно начатое лечение приводят к полной регрессии клинических симптомов фуникулярного миелоза у всех больных, тогда как при длительности заболевания более 6 месяцев даже при назначении адекватной терапии отмечалась только частичная регрессия неврологической симптоматики.

Выводы: наличие у больного клинической картины фуникулярного миелоза даже при отсутствии лабораторных показателей крови требует более углубленного гематологического дообследования и более скрупулезного сбора анамнеза.

*Ключевые слова:* фуникулярный миелоз, В12-дефицитная анемия.

**Yu.V. Shatohin, I.V. Snezhko, Z.A. Goncharova, S.E. Dokuchaev,  
N.A. Fomina-Chertousova**

## TO THE PROBLEM OF ESSENTIAL EARLY DIAGNOSTICS OF FUNICULAR MYELOSIS

*Rostov State Medical University*

*Нахичеванский, 29. E-mail: I. Snezhko@ mail.ru*

*29 Nahichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: I. Snezhko@ mail.ru*

Purpose: to assess indices of peripheral blood and marrow of patients with funicular myelosis in comparison with anamnesis data in order to establish the reason of myelinopathy development to prescribe early pathogenic therapy.

Material and Methods: 25 patients aged 42-79, with verified funicular myelosis, having various possible reasons of myelinopathy development in anamnesis. The received results: the assessment of indices of peripheral blood and marrow revealed changes characteristic of B12 deficiency anaemia. Early diagnostics of B-12 deficiency anaemia and well-timed beginning of treatment have been shown to result in complete regression of clinical symptoms of funicular myelosis in all patients, whereas in cases with prolongation of the disease for more than 6 months even adequate therapy resulted only in partial regression of neurologic symptomatology.

Summary: presence of clinical signs of funicular myelosis, even at absence of changes of laboratory blood indices, requires more profound examination and more scrupulous anamnesis taking.

*Key words:* funicular myelosis, B12- deficiency anaemia.

### Введение

Фуникулярный миелоз (myelosis funicularis; син. комбинированный склероз, болезнь Аддисона-Бирмера) (ФМ) – заболевание, в основе которого лежит дисметаболическое поражение задних и боковых канатиков спинного мозга, характеризующееся демиелинизацией нервных волокон и деструкцией осевых цилиндров. Патоморфологически наблюдается умеренная атрофия спинного мозга, а микроскопически выявляются очаги некроза, дегенерации и демиелинизации в задне-боковых канатиках спинного мозга. Таким

образом, в основе миелинопатии при фуникулярном миелозе лежит демиелинизация с последующей аксональной дегенерацией [1].

ФМ почти всегда сочетается с В12-дефицитной анемией, но может встречаться и без нее, однако дефицит витамина В12 является решающим в патогенетическом механизме развития как ФМ, так и анемии [2]. В12 – дефицитная анемия (впервые описанная под названием пернициозная (гибельная) анемия в 1855 г. Т.Аддисоном, а затем в 1870-80гг. А.Бирмером), относится к группе мегалобластных анемий. Мегалобластные анемии - группа заболеваний, характеризующихся нарушением синтеза





ДНК, в результате чего нарушается деление всех быстро-пролиферирующих клеток (клеток кожи, желудочно-кишечного тракта, слизистых оболочек и, в первую очередь, кроветворных клеток). Гемопоэтические клетки относятся к быстроразмножающимся элементам, поэтому анемия (возможны нейтропения, тромбоцитопения) является наиболее ярким и основополагающим клиническим фактором. Классическая картина пернициозной анемии включает три основных синдрома: анемический (гиперхромная мегалоцитарная анемия с наличием дегенеративных форм эритроцитов, включения железа в клетках мононуклеарных фагоцитов), желудочно-кишечный (ахилия, глоссит), неврологический (фуникулярный миелоз) [3].

В случае медленного развития заболевания выраженность анемии по лабораторным показателям оказывается большей, чем можно было бы ожидать при анализе клинических данных. Однако, учитывая тот факт, что дефицит витамина В12 может одновременно вызывать анемический синдром и дисметаболическую демиелинизацию задних и боковых канатиков спинного мозга, нередко мы видим, что неврологические симптомы могут опережать изменения в гемопоэтических клетках [4]. Таким образом, выраженность неврологических нарушений не всегда коррелирует с выраженностью анемического синдрома. По данным Мари Э. Вуд и соавт. (1997), у 25% больных с дефицитом кобаламина имеют место главным образом неврологические нарушения при нормальных или почти нормальных гематологических показателях. Наиболее частыми симптомами являются болезненные парестезии и атактическая походка [5].

В зависимости от преобладания поражения задних или боковых столбов спинного мозга выделяют три клинические формы: заднестолбовая, пирамидная, комбинированная.

При поражении задних столбов спинного мозга в клинике наблюдается: потеря пространственной, глубокой и вибрационной чувствительности, сенсорная атаксия и затруднения при ходьбе, нарушение функции тазовых органов по типу недержания, снижение сухожильных рефлексов до полной арефлексии, атрофия мышц нижних конечностей, сохранение болевой чувствительности.

При поражении боковых столбов (спастический спинальный паралич): нижний спастический парализ с повышением тонуса, повышенными рефлексами и клонусами, положительные патологические рефлексы, нарушение функции тазовых органов по типу задержки [6].

Длительный дефицит витамина В12 приводит к поражению отдельных периферических и черепных нервов, нарушению зрения в виде офтальмоплегии, ретробульбарному невриту. Иногда у больных имеются нервно-психические нарушения в виде депрессии, эмоциональной лабильности, нарушений памяти или органического психоза. Могут развиваться тяжелые ментальные нарушения в виде галлюцинаторно-бредового и параноидного синдромов, деменции [7].

Диагноз фуникулярный миелоз не представляет трудностей при наличии сочетанного поражения задних и боковых канатиков спинного мозга с характерными изменениями крови, ахилией и глосситом.

Возможные осложнения в ранней постановке диагноза ФМ возникают тогда, когда неврологические симптомы развиваются до появления анемического синдрома. Основополагающим фактором в данном случае является стерильная пункция с обнаружением мегалобластов в стерильном пунктате [7].

Целью настоящего исследования явилась оценка показателей периферической крови и костного мозга больных фуникулярным миелозом в сопоставлении с анамнестиче-

скими данными о возможной причине развития миелопатии для раннего назначения патогенетической терапии.

### Материалы и методы

Обследованию подверглись 25 пациентов в возрасте от 42 до 79 лет с подтвержденным фуникулярным миелозом, в анамнезе которых имели место следующие возможные причины развития миелопатии:

1. атрофический гастрит – у 9,
2. гастрэктомия – у 5,
3. резекция желудка – у 2,
4. резекция подвздошной кишки – у 2,
5. повреждение эпителия желудка химическим веществом (уксусная эссенция) – у 2,
6. состояние после наложения желудочно-кишечного анастомоза – у 1,
7. лимфома тонкой кишки – у 1,
8. вегетарианство – у 1,
9. болезнь Крона – у 1.

### Результаты и обсуждение

При оценке показателей периферической крови и костного мозга были выявлены следующие изменения. Снижение содержания гемоглобина ниже 120 г/л отмечалось у 19 (76%) пациентов, гиперхромия эритроцитов – у 22 (88%) макроцитоз эритроцитов – у 20 (80%), мегалокитоз эритроцитов – у 4 (16%), анизоцитоз – у 9 (36%), пойкилоцитоз – у 5 (20%), овалоцитоз – у 2 (8%), единичные нормоциты и мегалобласты – у 2 (8%), тельца Жолли – у 12 (48%), кольца Кебота – у 9 (36%), пылинки Вейденрейха – у 5 (20%), базофильная пунктация эритроцитов – у 5 (20%), снижение количества ретикулоцитов – у 16 (64%), количество лейкоцитов ниже  $3 \times 10^9/\text{л}$  – у 8 (32%), гигантские сегментоядерные нейтрофилы с гиперсегментированными ядрами – у 22 (88%), увеличение уровня миелопероксидазы нейтрофилов – у 23 (92%), снижение количества тромбоцитов до  $50-100 \times 10^9/\text{л}$  – у 7 (28%), увеличение времени кровотечения – у 6 (24%), в миелограмме – выраженная гиперплазия эритроидного ростка и мегалобластический тип кроветворения – у 8 (32%), преобладание базофильных форм эритроидных клеток («синий костный мозг») – у 5 (20%), гигантские миелоциты, метамиелоциты и полисегментированные нейтрофилы – у 19 (76%), гигантские мегакариоциты с нарушением отщепления тромбоцитов – у 6 (24%), умеренная гипербилирубинемия за счет свободного (непрямого) билирубина – у 12 (48%).

Диагноз В12 – дефицитной анемии был поставлен в течение месяца от начала клинических проявлений фуникулярного миелоза – у 10 (40%) больных (1-я группа), в течение менее 6 месяцев – у 8 (32%) (2-я группа), спустя 6 месяцев – у 7 (28%) (3-я группа). Проводимая терапия витамином В12 вызвала полную регрессию клинических симптомов фуникулярного миелоза у всех больных в 1-й группе (100%), в то время как во второй группе выздоровление отмечалось у 7 больных (87,5%), а в третьей группе отмечалась только частичная регрессия неврологической симптоматики у 6 (85,8%) пациентов.

Приводим одно из собственных клинических наблюдений, демонстрирующих позднюю постановку диагноза, а отсюда и несвоевременность лечения.

Больная П., 51 года, поступила в клинику нервных болезней и нейрохирургии с жалобами на слабость и скованность в ногах, нарушение почерка, тазовые нарушения (недержание мочи). Считает себя больной с 49 лет, когда



появились парестезии в конечностях, слабость в ногах. Данные симптомы были связаны с психоэмоциональной нагрузкой. Больная в амбулаторных условиях получала терапию без положительного эффекта. Через 3 месяца от начала заболевания был диагностирован рак тела желудка, по поводу которого больная была прооперирована, гистологическое заключение - аденокарцинома. После хирургического лечения больная самостоятельно не передвигалась, появились грубые тазовые нарушения (недержание мочи). После стационарного обследования (неоднократное проведение МРТ грудного, шейного, пояснично-крестцового отделов спинного мозга, люмбальных пункций), был поставлен диагноз: ишемическая миелопатия. Проводимая терапия ангиопротекторами, ноотропами эффекта не имела. При повторной госпитализации через 1 месяц была проведена повторная люмбальная пункция (реакция Панди +++++, цитоз 154 в 1 мм<sup>3</sup>, нейтрофилы 90%). Больная выписана с диагнозом: подострый миелополарадикулоневрит, после проведенной терапии кортикостероидами с незначительным клиническим улучшением. В течение 2х лет больная лечилась амбулаторно. При поступлении в клинику в марте 2009 года в неврологическом статусе: ЧМН – без особенностей, сухожильные рефлексы D=S, высокие, с расширением рефлексогенных зон, патологические стопные знаки с 2-х сторон, брюшные рефлексы угнетены. Грубые нарушения глубокой чувствительности в пальцах рук и ног. В позе Ромберга с открытыми глазами – неустойчива, с закрытыми – падает. Походка «псевдотабетическая». В лабораторных анализах крови обращали на себя внимание: макроцитоз при уровне гемоглобина выше 140г/л, увеличение уровня миелопероксидазы нейтрофилов, в миелограмме - увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов, гиперсегментированные нейтрофилы. Анализ спинномозговой жидкости – без особенностей. При иммуноферментном анализе спинномозговой жидкости: антитела к *Treponema Pallidum* (сумм.) – отрицательно, антитела к *Treponema Pallidum* (IgG) – отрицательно. РПГА и РИФЦ ликвор на сифилис – отрицательная. Реакция связывания комплимента – отрицательная. В иммунограмме – повышение уровня иммуноглобулинов (IgA-2,0 г/л; IgM-1,4 г/л), ЦИК – 142 у.е.; обнаружение АТ к ДНК (ОП кр=0,304; ОП сыв=0,779), что не позволяло исключить наличие аутоиммунного процесса.

Учитывая жалобы больной, неврологический статус, данные анамнеза (оперирована по поводу рака тела желудка, анемический синдром); неуклонно прогрессирующее течение заболевания, отсутствие эффекта от проводимой терапии (метаболической, сосудистой, кортикостероидной), данных дополнительных исследований (стеральная пункция, лабораторные исследования крови, ликвора, отрицательные серологические реакции на сифилис, данных МРТ позвоночника и спинного мозга – умеренно

выраженный остеохондроз), был поставлен диагноз: фуникулярный миелоз. На фоне проводимого лечения (ежедневного введения витамина В12 в дозе 1000мкг в течение 14 дней) отмечено увеличение силы, скорости и объема движений в ногах, улучшение функции тазовых органов. Больная была выписана с рекомендациями продолжить терапию витамином В12.

Учитывая начало лечения спустя 2 года с момента появления основных симптомов, результаты 3-месячной терапии показали, что выздоровления достигнуть не удалось, так как полный регресс спинальных симптомов может быть достигнут только при условии начала лечения через несколько недель от момента появления симптомов поражения спинного мозга.

### Выводы:

1. Наличие у больного клинической картины фуникулярного миелоза даже при отсутствии нарушений лабораторных показателей крови требует более углубленного гематологического дообследования (определение концентрации витамина В12 в сыворотке крови, стеральная пункция) и более скрупулезного сбора анамнеза.

2. Все пациенты с мегалобластной анемией должны быть обследованы неврологом на предмет выявления ранних признаков поражения спинного мозга, так как поздняя постановка диагноза на стадии появления неврологических жалоб, которые говорят о выраженном демиелинизирующем процессе, ведет к возможности неполного восстановления функции даже после проведения адекватного лечения.

3. Для раннего определения поражения задних и боковых столбов спинного мозга больных с мегалобластной анемией на стадии отсутствия неврологических жалоб необходимо проведение электронейромиографии, которая позволяет принять профилактические меры и составить прогноз.

4. К современным особенностям течения В12 -дефицитных состояний относятся:

- Отсутствие корреляции между лабораторными данными и степенью неврологических проявлений ФМ.
- Появление неврологического дефицита до манифестирования анемического синдрома.
- Расширение круга дифференцируемых заболеваний как в структуре ФМ (нейросифилис, рассеянный склероз, атеросклеротическая и дискогенная миелопатия, наследственные спино-церебральные дегенерации), так и в структуре В12 - дефицитных состояний (вегетарианство, глистные инвазии, туберкулез подвздошной кишки, лимфома тонкой кишки или желудка, врожденные ферментопатии, токсические поражения эпителия желудка, опухоль желудка, состояние после хирургического лечения по поводу патологии желудочно-кишечного тракта).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К.М. Гематология. Новейший справочник. М. Изд-во Эксмо. СПб. Изд-во Сова. 2004; 273-284.
2. Гусева С.А., Вознюк В.П. Болезни системы крови. Справочник. М. «МЕД пресс-информ». 2004; 55-64.
3. Воробьев А.И. (ред.) Руководство по гематологии. Издание 3-е перераб. и дополн. М. Ньюдиамед, 2005; 3: 197-214.
4. Демидова А.В. Анемии. Учебно-практическое пособие. М. «ЛАКА». 1996; 60-71.
5. Мари Э. Вуд Пол А. Банн. Секреты гематологии и онкологии. М. Бином. 1997; 57-63.
6. Рукавицын О.А. (ред.). Гематология. СПб.: ООО «Д.П.». 2007; 68-91.
7. Фред Дж. Шиффман. Патологическая физиология крови. СПб. Невский диалект. 2000; 93-100.



УДК: 159.9-055.52:616-006-053.2-058

<sup>1</sup>Коновалова М.В., <sup>1</sup>Вашура А.Ю., <sup>2</sup>Литвинов Д.В., <sup>2</sup>Скоробогатова Е.В.,  
<sup>3</sup>Филиппова Н.Е., <sup>4</sup>Бельмер С.В., <sup>1</sup>Цейтлин Г.Я.

## ИЗУЧЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У ДЕТЕЙ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

<sup>1</sup>ФГУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии»  
Минздравсоцразвития России

<sup>2</sup>ФГУ «Российская детская клиническая больница» Минздравсоцразвития России

<sup>3</sup>ФГУ «Санаторий Русское поле» Минздравсоцразвития России

<sup>4</sup>РГМУ, Кафедра детских болезней № 2

Россия, 117997, г. Москва, Ленинский проспект, 117. [marinakonov@mail.ru](mailto:marinakonov@mail.ru), 8 962 927 41 12

Цель. Оценить значение измерения энергопотребности (Еп) для индивидуализации нутритивной поддержки детей с онкологическими заболеваниями в процессе химиотерапии. Материалы и методы. Обследовано 43 ребенка. Группа 1–15 детей с онкологическими заболеваниями, получающих ПХТ (5 человек), и в посттрансплантационном периоде (10 человек), из них 5 детям по клиническим показаниям обследование проводилось повторно, т.е. всего в этой группе сделано 21 определение энергопотребности покоя (Еп). Группа 2–14 детей с онкологическими заболеваниями, закончивших лечение. Группа 3 (группа сравнения) – 14 детей с гастроэнтерологической патологией. Еп измеряли методом непрямой калориметрии, затем вычисляли энергию основного обмена (Еом) по формуле  $E_{om} = 90\%E_{п}$  и сравнивали ее с энергией основного обмена Еоф, рассчитанной по формуле ФАО/ВОЗ (1985).

Результаты. В группе 1 средние значения Еом и Еоф существенно различаются: 986,5 и 1286,9 ккал, соответственно, ( $p < 0,05$ ). В группе 2 значение Еом также ниже Еоф, однако, это различие не существенно. Количество детей со сниженной Еом в группе 1 существенно больше, чем в группах 2 и 3 – 76,2%, 42,9%, 28,6%, соответственно, ( $p < 0,05$ ). Наоборот, в группе 3 больше детей с повышенной Еом, чем в группе 1 ( $p < 0,01$ ). Отмеченное снижение энергопотребности у детей 1-й группы в основном связано с токсическим влиянием ПХТ и трансплантации на процессы метаболизма.

Заключение. Полученные данные обосновывают необходимость постоянного мониторинга энергопотребности детей с онкологическими заболеваниями в процессе специального лечения для выработки индивидуальной программы диетологического сопровождения, оценки эффективности и коррекции этой программы.

*Ключевые слова:* дети, онкологические заболевания, энергия основного обмена, нутритивная поддержка.

<sup>1</sup>Konovalova M.V., <sup>1</sup>Vashura A.Yu., <sup>2</sup>Litvinov D.V., <sup>2</sup>Skorobogatova E.V.,  
<sup>3</sup>Filippova N.E., <sup>4</sup>Belmer S.V., <sup>1</sup>Tseitlin G.Ya.

## ENERGIC METABOLISM STUDIES IN PEDIATRIC CANCER PATIENTS

<sup>1</sup>The Federal Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

<sup>2</sup>The Russian children clinical hospital.

<sup>3</sup>“Russkoe pole” sanatorium.

<sup>4</sup>The Russian State Medical University, Pediatrics department № 2

The aim. To estimate heat capacity (C) measurements for individual dietary support of pediatric cancer patients during chemotherapy.

Material and methods. 43 cancer children are examined. Group 1: 15 children, 5 children receiving polychemotherapy, 10 children – in post-BMT period (5 of them were re-examined on clinical indications). Thus we got 21 resting heat capacity measures. Group 2 includes 14 children with cancer after completing chemotherapy. Group 3 (control group) – 14 children with gastroenterological pathology. (C) is determined by indirect calorimetry, then basal metabolic rate (BMR) is calculated by formula  $BMR = 90\%C$  and compared with (Cf), calculated by formula WHO (1985).

The results. In group 1 the average values of BMR and Eoф considerably differ: 986,5 and 1285,9 kcal accordingly ( $p < 0,05$ ). In group 2 BMR value is lower than Cf, however the difference is inconsiderable. The amount of children with decreased BMR in group 1 is considerably higher than in groups 2 and 3 – 76,2%; 42,9% and 28,6% accordingly ( $p < 0,05$ ). On the contrary group 3 includes more children with increased BMR, than group 1 ( $p < 0,01$ ). The marked decrease of heat capacity (C decrease) in group 1 is mainly associated with toxic effects of polychemotherapy and BMT on metabolic processes.

Conclusion. The findings justify the need to monitor the pediatric cancer patients during special treatment to estimate their heat capacity to work out individual programs of dietary support with further assessment of effectiveness and correction.

*Key word:* children, cancer, basal metabolism, basal metabolic rate, dietary support.



### Введение

Питание является одним из важнейших факторов, оказывающих влияние на состояние здоровья и эффективность механизмов адаптации организма к неблагоприятным условиям. Нарушение питания в значительной степени снижает эффективность лечения и увеличивает риск развития и интенсивность осложнений. Рационы питания, разработанные в соответствии с современными требованиями, не всегда достаточно адекватны потребностям конкретного пациента в энергии и пищевых ингредиентах, поскольку базируются на усредненных формулах и в минимальной степени позволяют учитывать индивидуальные показатели состояния питания и нарушения метаболизма у конкретного ребенка.

Эта общая позиция имеет особенное значение в детской онкологической клинике в связи со значительными нарушениями состояния питания и метаболизма у наших пациентов, происходящих как вследствие самого заболевания, так и в процессе химиотерапии [1,2]. У детей, получающих химиотерапию, эти нарушения носят выраженный динамический характер, что диктует необходимость применения клинически приемлемой методики мониторинга энергетической потребности ребенка.

Основная цель исследования – оценить значение определения энергопотребности (Еп) для индивидуализации нутритивной поддержки детей с онкологическими заболеваниями в процессе химиотерапии.

### Материалы и методы исследования.

Обследовано 43 ребенка в возрасте от 5 до 17 лет (медиана – 11,7 лет); девочек – 28, мальчиков – 37. Группа 1–15 детей с онкологическими заболеваниями, получающих ПХТ (5 человек), и в посттрансплантационном периоде (10 человек), из них 5 детям по клиническим показаниям обследование проводилось повторно, т.е. всего

в этой группе сделано 21 определение энергопотребности покоя (Еп). Группа 2–14 детей с онкологическими заболеваниями, закончивших лечение. Группа 3 (группа сравнения) – 14 детей с гастроэнтерологической патологией. Нозологические формы онкологических и неонкологических заболеваний у обследованных детей представлены в табл. 2.

Еп измеряли методом непрямой калориметрии, затем вычисляли энергию основного обмена (Еом):  $E_{ом} = 90\%E_{п}$  и сравнивали ее с энергией основного обмена, рассчитанной по формуле (Еоф) ФАО/ВОЗ (1985) (Табл. 1).

Таблица 1

### Формулы ФАО/ВОЗ для расчета энергии основного обмена у детей

Возраст (лет)	Формула для расчета Еоф (ккал/сут)
<b>Мальчики</b>	
0 – 3	$60,9 \times \text{ФМТ} - 54$
3 – 10	$22,7 \times \text{ФМТ} + 495$
10 – 18	$17,5 \times \text{ФМТ} + 651$
<b>Девочки</b>	
0 – 3	$61 \times \text{ФМТ} - 51$
3 – 10	$22,5 \times \text{ФМТ} + 499$
10 – 18	$12,2 \times \text{ФМТ} + 746$

Примечание. Еоф – энергия основного обмена, вычисленная по формуле ФАО/ВОЗ; ФМТ – фактическая масса тела.

Изучение энергетического обмена методом непрямой калориметрии проводилось с использованием метаболога Ultime CCM (Medgraphics, USA).

Детей обследовали в состоянии натощак, в положении полусидя, время измерения – 15 минут.

Достоверность различий оценивалась с применением непараметрических статистических методов.

Результаты измерения Еом представлены в таблице 2.

Таблица 2

### Энергия основного обмена у детей в исследуемых группах

№№ п/п	Пол, возраст	Диагноз	ВОЗ Еоф (ккал)	Еом (ккал)	Еом /Еоф (%)
Группа 1					
Онкогематологическая клиника					
1.	М, 16л. 1м.	ОЛЛ	1491,0	670,5	44,9↓↓
	М, 16л. 2м.	ОЛЛ	1587,0	1966,5	123,9↑
2.	М, 14л. 1м.	С-а Ю.	1508,5	1167,3	77,3↓
3.	Д., 17 л. 6 м.	ОГМ	1191,3	729	61,1↓↓
4.	Д., 13л. 2м.	С-а Ю.	1197,0	883	73,7↓
5.	Д., 6л 3м.	ОЛЛ	994,0	894	89,9↓
Отделение ТКМ					
1.	М, 17л. 6м	ОМЛ	1496,0	1358	90,7
	М, 17л. 6 м.	ОМЛ	1496,3	1442,7	96,4
2.	М, 15л. 6м.	ОЛЛ	1543,5	1043,1	67,5↓↓
3.	М, 12л. 5м.	ХМЛ	1412,0	1196	84,7↓



	М,12л. 6 м.	ХМЛ	1351,0	751,5	55,6↓↓
	М,12л. 6 м.	ХМЛ	1368,5	677	49,4↓↓
4.	М.,12 л.2 м	А.А.	1141,0	1102,5	96,6
5.	М. 10 л.	ОМЛ	1176,0	1179,9	100,3
6.	М.,11 л.	А. А.	1584,0	1314	82,9↓
7.	М.10л.10м.	ОМЛ	1113,0	930	83,5↓
	М.10 л10м.	ОМЛ	1106,0	725,4	65,5↓↓
8.	М., 5л 3м.	ОЛЛ	885,4	758,7	85,6↓
9.	Д , 6 л.5м.	ОЛЛ	1477,8	869,4	58,8↓
10.	Д . 5л. 4м.	ОМЛ	944,5	599,4	63,4↓↓
	Д . 5л. 4м.	ОМЛ	960,3	458,1	47,7↓↓
Средние значения			1286,9	986,5 *	
Группа 2					
1.	М,16 л	ОЛЛ	1701,0	1020,6	60↓↓
2.	М, 11л.7м.	МБ	1132,0	824,4	72,8↓
3.	М, 10л.3м.	ОЛЛ	1194,0	1346,4	112,7↑
4.	М, 8л.11м.	ОЛЛ	1249,0	1346,4	107,7
5.	М, 8л.2м.	ОЛЛ	1178,0	1346,4	107,8
6.	М, 7л.10м.	Ф.Г.	1119,0	1001,7	89,5↓
7.	М,7л.5м.	ОЛЛ	1117,0	910,8	81,5↓
8.	М, 6л.8м.	ОЛЛ	1062,5	775,8	73,0↓
9.	Д , 15л.5м.	ОМЛ	1089,0	814,5	74,7↓
10	Д , 12л.3м.	ОЛЛ	1250	1513,8	121,1↑
11	Д , 10л.	ОЛЛ	1405,0	1410,3	100,3
12	Д , 9л.5м.	ОГМ	1149,0	1162,8	101,2
13	Д , 8л.9м.	ОЛЛ	1152,0	1045,8	90,7
14	Д , 8л.7м.	ОЛЛ	1039,0	986,4	94,9
Средние значения			1202,6	1011,4	
Группа 3					
1	М.17 л.	НЯК	1701	1687,5	99,2
2	М., 16л.3м.	Болезнь Крона	1771	1356	76,5↓
3	М., 15л.6м.	Болезнь Уиппла	1508,5	1710	113,3↑
4	М., 12 л.4м.	НЯК	1436,75	1407,6	97,9
5	М., 9л.10м.	Болезнь Крона	1090	848	77,7↓
6	М., 9л. 5м.	ФНК	1126,1	1412,1	125,3↑
7	М., 5л.4м.	НЯК	846,9	1134	133,9↑
8	Д .16л. 6 м.	Болезнь Крона	1374	909	67,4↓
9	Д ,15л.04м.	НЯК, цирроз печени	1173	1429	121,8↑
10	Д.,12л.11м.	НЯК	1301	1086,3	83,4↓
11	Д.,13л.	СМА ? СРК ?	1145	1077,3	94,0
12	Д .10л.01м.	Целиакия.	1303,5	1427,4	109,5
13	Д., 9л.	Болезнь Крона	971,7	879,3	90,4
14	Д., 6л. 2м.	Целиакия	870,25	980,1	112,6↑
Средние значения			1258,5	1250,3	

Примечания. Еоф – энергия основного обмена, вычисленная по формуле ФАО/ВОЗ; Еом – энергия основного обмена, вычисленная на основании показаний метаболога; С-а Ю. – саркома Юинга; ОГМ – опухоль головного мозга; Ф.Г. – фиброзная гистиоцитома мягких тканей головы; НЯК – неспецифический язвенный колит; ФНК – функциональное нарушение кишечника; СМА синдром мальабсорбции; СРК – синдром раздраженной кишки; А.А. – апластическая анемия; А.Ф. – анемия Фанкони; Р.С. – рассеянный склероз.  
\*) p<0,05



Важной задачей исследования было сравнить величины Еоф и Еом у детей в исследуемых группах. В группе 1 средние значения Еом и Еоф существенно различаются: 986,5 и 1286,9 ккал, соответственно, ( $p < 0,05$ ). В группе 2 значение Еом также ниже Еоф, однако, это различие не достоверно. В группе 3 эти показатели оказались практически равными.

Для каждого из обследованных детей вычисляли отношение Еом/Еоф (%%) и сравнивали количество пациентов с величиной Еом /Еоф, большей, меньшей или равной 100% в каждой группе. Значимой считали разницу  $\geq 10\%$ .

Таблица 3

### Распределение пациентов в исследуемых группах соответственно значению Еом /Еоф

Еом /Еоф (%%)	Исследуемая группа		
	№1 (n=21)	№2 (n=14)	№3 (n=14)
> 100	4,8%	14,3%	35,7%**
<100	76,2%*	42,9%	28,6%
=100	19,0%	42,8%	35,7%

Примечание. Еом и Еоф – как в табл.2

\* разница достоверна между группами 1 и 2, и группами 1 и 3

\*\* разница достоверна между группами 1 и 3

Из данных табл. 3 видно, что в группе 1 количество детей со значением Еом/Еоф<100% равнялось 76,2% в то время, как в группе 2 этот показатель был почти в 2 раза меньше и составил 42,9% ( $p < 0,05$ ); в группе 3 пациентов со сниженным уровнем основного обмена было в 2,5 меньше, чем в группе 1 ( $p < 0,05$ ). В то же время, в группе 3 детей с увеличенным уровнем основного обмена было существенно больше, чем в группе 1 ( $p < 0,01$ ). Разница по этому показателю между группами 1 и 2 и группами 2 и 3 не достоверна.

Из данных, приведенных в таблицах 2 и 3, видно, что у абсолютного большинства детей с онкологическими и неонкологическими заболеваниями, получающих химиогормонотерапию, а также находящихся в посттрансплантационном периоде, отмечается существенное уменьшение энергии основного обмена.

Отмеченное снижение энергии основного обмена, скорее всего, связано с токсическим действием химиогормонотерапии на метаболизм и функциональное состояние ЖКТ, а также с дефицитом нутриентов и гипокинезией [3,4,5]. О негативном влиянии химиотерапии на энергетический обмен свидетельствует и значительно большее количество детей со

сниженной энергией основного обмена в группе 2, в анамнезе у которых также имеется продолжительный период противоопухолевого лечения, по сравнению с пациентами из группы 3, у которых есть серьезные нарушения ЖКТ, но не было цитостатической химиотерапии.

Кроме того негативное влияние химиотерапии на величину энергии основного обмена подтверждается, тем фактом, что наиболее значительное (30–50%) снижение этого показателя отмечается почти в половине (46,7%) измерений у детей в различные сроки после трансплантации (в таблице 2 отмечены знаком  $\downarrow\downarrow$ ). У этих детей при биоимпедансном анализе тканевого состава тела отмечено значительное снижение активно метаболизирующей клеточной массы и относительное увеличение жировой ткани (собственные неопубликованные данные), что коррелирует с отмеченным выше у этих пациентов снижением энергии основного обмена. Напротив, из 14 детей в группе 2, у которых после окончания химиотерапии прошел большой период времени, энергия основного обмена была значительно снижена только у одного ребенка, точно так же, как только у 1 пациента из отделения гастроэнтерологии.

Необходимо отметить еще один важный феномен, требующий углубленного изучения, – увеличение энергии основного обмена более чем у трети пациентов с гастроэнтерологическими заболеваниями. Аналогичное увеличение энергии основного обмена имело место только во 2-й группе у 1 ребенка, и ни в одном случае не встречалось при обследовании детей, получающих противоопухолевое лечение.

В этом сообщении мы не обсуждаем вопросы, связанные со значением дыхательного коэффициента для понимания индивидуальных особенностей метаболизма и определения квоты отдельных макронутриентов в энергообеспечении организма, так как это выходит за рамки темы.

### Выводы

1. Метод непрямой калориметрии (метаболография) адекватен задаче организации лечебного питания в онкопедиатрической клинике.
2. У абсолютного большинства обследованных детей с онкологическими заболеваниями в процессе специального лечения отмечается снижение энергопотребности.
3. Большая вариабельность значений энергии основного обмена у обследованных пациентов со значительными отклонениями от расчетных величин диктует необходимость проведения постоянного мониторинга этого показателя в процессе специального лечения и диспансерного наблюдения для выработки индивидуальной стратегии диетологического сопровождения ребенка, оценки адекватности и своевременной организации нутритивной поддержки.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Carter P., Can D., van Eys J., Goody D. Nutritional parameters in children with cancer // J. An. Diet. Assoc, 1983, vol.82, P. 616-622.
2. Delbecque-Boussard L, Gottrand F, Ategbo S, et al. Nutritional status of children with acute lymphoblastic leukemia: a longitudinal study. // Am J. Clin. Nutr., 1997; 65:95–100.
3. Reilly JJ., Brougham M., Montgomery C et al. Effect of glucocorticoid therapy on energy intake in children treated for acute lymphoblastic leukaemia // J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001, vol. 86, P. 3742-3745.
4. Скворцова Ю.В., Скоробогатова Е.В., Масчан А.А. Поражение гастроинтестинального тракта после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови у детей. // Вопросы детской диетологии. – 2009. - т.7. №2. С. 36-40
5. Майорова О.А., Румянцев А.Г. Особенности желудочно-кишечного тракта у пациентов с онкологическими заболеваниями и при проведении цитостатической терапии (клинико-морфологические и функциональные изменения) // Российский педиатрический журнал. - 2001. - №6. - С. 44-43.

ПОСТУПИЛА: 25.10.2010

# Правила оформления рукописей статей в научно-практическом журнале «Медицинский вестник Юга России»

1. Журнал принимает для публикации обзорные статьи по актуальным проблемам медицины, лекции, клинические исследования, рефераты зарубежных изданий, результаты оригинальных клинических и экспериментальных исследований, редкие клинические случаи, информацию о юбилейных и памятных датах, истории медицины.
2. В начале первой страницы в верхнем левом углу указывается УДК, затем по центру фамилии и инициалы авторов, название статьи (заглавными буквами), полное название учреждения и отдела (кафедры, отделения, лаборатории), в котором выполнялась работа, почтовый адрес с индексом учреждения, E-mail или телефон контактного лица.

УДК: 612.23:616.12

Микашинович З.И., Гридасова Р.А., Олемпиева Е.В., Коваленко Т.Д.

НОВЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Ростовский государственный медицинский университет,

кафедра общей и клинической биохимии № 1,

Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: [olempieva@yandex.ru](mailto:olempieva@yandex.ru)

3. Далее размещается краткое резюме объемом до 16 строк на русском и английском языках с указанием фамилий и инициалов авторов, названия статьи, учреждения. Текст резюме оригинальных статей следует структурировать с указанием подзаголовков: цель, материалы и методы, результаты, заключение. В резюме обзора и лекции отразить основное содержание. В конце резюме указать не более 5 ключевых слов.
4. Объем оригинальной статьи не должен превышать 10 страниц печатного текста, случая из практики 5 страниц, лекции и обзора 20 страниц.
5. Рукопись печатается в текстовом редакторе Word. Шрифт Times New Roman, размер 12, межстрочный интервал 1,5. Поля: левое – 2 см, верхнее – 2 см, нижнее – 2 см, правое – 2 см.
6. Оригинальные статьи должны содержать следующие разделы: введение (актуальность проблемы, цель исследования), материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, краткое заключение или выводы (только по собственному материалу).
7. Таблицы и иллюстрации (рисунки, диаграммы, чертежи, фотографии) размещаются по ходу текста. Фотографии таблиц и диаграмм не принимаются. Каждая таблица и иллюстрация должны иметь порядковый номер, название и пояснение. Все пояснения, включая расшифровку аббревиатур, указываются в примечании.
8. Общее количество таблиц и иллюстраций в оригинальной статье не более трех, в лекции и обзоре не более пяти.
9. Список литературы печатается в конце статьи по требованиям ГОСТ № 7.1-2003. Все работы перечисляются в порядке цитирования, а не в алфавитном порядке. В тексте дается ссылка на порядковый номер литературного источника [в квадратных скобках]. Статья предполагает не более 10 источников, обзор – не более 40. Не допускаются ссылки на работы, которых нет в тексте статьи, на диссертации, авторефераты, неопубликованные работы, а также на работы многолетней давности (> 10 лет). Исключение составляют только редкие высокоинформативные работы.
10. В конце статьи необходимо указать фамилию, имя и отчество автора, с которым редакция может вести переписку, точный почтовый адрес с индексом, телефон, факс, адрес электронной почты.
11. В редакцию статья представляется только в электронном варианте.
12. Все статьи, принятые к рассмотрению, рецензируются независимыми экспертами. Для автора рецензия анонимна. Статья может быть опубликована только при наличии положительной рецензии.
13. Статья следует направлять по адресу: 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, редакция журнала «Медицинский вестник Юга России». E-mail: [rostgmu-journal@rambler.ru](mailto:rostgmu-journal@rambler.ru)