

В.В. Черепанова¹, Л.Н. Тарасова², С.Г.Владимирова², Н.А.Зорина²
ИЗМЕНЕНИЕ ГЕМОСТАЗА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПОЛНОСТЬЮ
ТРАНСРЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ТЕРАПИИ ОСТРОГО
ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА

¹ ГБУЗНО «Городская больница №33», Нижний Новгород,

² ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови
ФМБА России»

Среди острых нелимфобластных лейкозов частота встречаемости острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) в 70-х гг. прошлого века составляла 2-5%, а в настоящее время - от 5 до 15% [2]. Наш интерес к этой достаточно редкой форме лейкоза был вызван ростом заболеваемости в 1995-97 гг. в Кировской области; по данным Кировского НИИ гематологии и переливания крови, больные с этим вариантом в указанные годы составили 43% среди острых миелоидных лейкозов.

ОПЛ представляет собой четко очерченную нозологическую форму в рамках острых миелоидных лейкозов с характерными клинико-лабораторными признаками (типичная морфология опухолевых клеток, тяжелый геморрагический синдром, гематомный тип кровоточивости, избыточно активированный фибринолиз, ДВС-синдром).

Именно с острым промиелоцитарным лейкозом связано одно из самых принципиальных открытий в области биологии лейкозов: обнаружен феномен дифференцировки бластных клеток промиелоцитарного лейкоза под воздействием дериватов ретиноевой кислоты - 13-цис-ретиноевой, полностью транс-ретиноевой (АТРА), 9-цис-ретиноевой. Применение АТРА (третиноин, весаноид) революционным образом изменило исходы терапии ОПЛ. Оно открыло новые перспективы и в лечении геморрагических осложнений. Снижение прокоагулянтной активности лейкозных клеток при применении АТРА является одним из механизмов, вовлеченных в разрешение коагулопатии [5,6]. Это происходит за счет уменьшения выработки ракового прокоагулянта (СР) и тканевого фактора (ТФ), выделяемых промиелоцитами [6]. С одной стороны, АТРА увеличивает экспрессию тканевого и урокиназного активаторов плазминогена – (t-РА, u-РА), с другой – ингибитора активатора плазминогена - PAI-1. В результате время эуглобулинового лизиса, характеризующее общий плазменный фибринолитический баланс, может быть не изменено или удлинено, а начальные признаки гиперфибринолиза, такие, как повышение количества D-димеров, быстро корригируются [9].

АТРА не оказывает влияния на синтез неспецифических протеаз (эластазы и химотрипсина), разрушающих несколько факторов свертывания (фибриноген, фактор Виллебранда) и усиливающих фибринолитическую систему путем протеолиза двух плазминовых ингибиторов - α -2-антиплазмина и ингибитора С1 эстеразы [5]. Однако, в процессе АТРА-терапии отмечается уменьшение протеолиза фактора Виллебранда [7].

АТРА увеличивает синтез цитокинов $IL-1\beta$ и $TNF-\alpha$, стимулирующих выработку эндотелием прокоагулянтов, ингибиторов активации фибринолиза, оказывающих антитромбомодулиновый эффект; таким образом, она способствует повышению прокоагулянтной активности [9].

Влияние АТРА на нормальные клетки комплексное. Она защищает эндотелий от протромботического и антитромбомодулинового эффекта цитокинов [7]. Препарат может увеличивать противосвертывающий потенциал, усиливая экспрессию тромбомодулина эндотелием и образуя комплекс тромбомодулин-тромбин, запуская систему протеинов С и S, инактивирующих факторы VIIIa и Va. Он повышает синтез t-РА эндотелием – с одной стороны, и в меньшей степени – синтез ингибитора активатора пламиногена PAI-1, - с другой, защищая от избыточного фибринолиза [9]. Моноцитарную прокоагулянтную активность АТРА подавляет [9]. На лейкозные клетки она может действовать как проадгезивный стимул, а на эндотелий – как противoadгезивный [5].

В последние годы появились публикации о тромбоэмболических осложнениях при ОПЛ, как острых артериальных, так и венозных [4,7]. Высокая вероятность возникновения тромбозов выявлена у пациентов с гиперлейкоцитозом и синдромом ретиноевой кислоты (СРК) [6]. До начала использования АТРА в индукционной терапии этого заболевания сведения о тромбоэмболиях были единичными [5].

Обобщая представленные данные литературы, следует сделать заключение, что, несмотря на большие достижения, полученные при изучении механизма действия АТРА, он до конца не ясен. Нет также четких прогностических критериев риска геморрагических и тромботических осложнений у больных ОПЛ. В литературе мы не встретили указаний на определенные периоды АТРА-терапии, в которые повышена опасность возникновения состояния гиперкоагуляции и тромбозов; не выработан минимальный комплекс доступных информативных тестов для диагностики гиперкоагуляции.

Учитывая вышеизложенное, мы сочли целесообразным проанализировать влияние АТРА на гемостаз при проведении протоколов Всероссийского центра изучения лейкозов (руководитель В.Г.Савченко), выявить периоды в динамике терапии, наиболее опасные возникновением геморрагических, претромботических и тромботических осложнений.

Сравнивали две группы больных: в 1 вошли 17 пациентов, которым проводили полихимиотерапию (ПХТ) по схеме "7+3" (до внедрения в клиническую практику АТРА), во 2 - 23 пациента, которых лечили с использованием протоколов, комбинирующих прием АТРА с ПХТ по схеме "7+3", которая была присоединена на 1-12 дни терапии (медиана 4 дня). АТРА назначалась в течение 30-45 дней дозе $45 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$. Характеристика больных ОПЛ представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика больных ОПЛ

Число больных	40
Возраст медиана	5-72 года 38 лет
Пол (м/ж)	10/30
Гемоглобин медиана	30-124 г/л 75,5 г/л
Количество лейкоцитов медиана	0,4-152×10 ⁹ /л 2,7×10 ⁹ /л
Количество тромбоцитов медиана	единичные-140×10 ⁹ /л 10×10 ⁹ /л
Промиелоциты в периферической крови, % медиана	0-96% 50%
Промиелоциты в костном мозге, % медиана	69,2-94% 85%
Отсутствие мегакариоцитов в костном мозге, %	у 38 из 40 95%
Цитогенетические исследования: Выполнены обнаружена t(15,17) не обнаружена другие аберрации (3 больных)	26 больных 22 (84,6%) 2 47, XX,+8 t(15, 17); 47, XX+9; 46, XX, кольцевидные хромосомы и множественные поломки

При поступлении в клинику пациентам проводили общепринятые в гематологии клинические методы исследования и полный объем лабораторных и инструментальных исследований, рекомендованный протоколами лечения. Подсчет тромбоцитов и лейкоцитов проводили в камере Горяева и с помощью гематологического анализатора Sysmex XT-2000i (Япония). Значения гемоглобина определяли, также используя этот прибор. Исследовали активированное парциальное тромбопластиновое время, выраженное в виде индекса АПТВ (отношение АПТВ исследуемой плазмы к таковому контрольной), протромбиновый индекс (ПТИ); концентрацию фибриногена, тромбиновое время (ТВ) (результаты выражали в виде индекса - отношения ТВ исследуемой плазмы к ТВ контрольной плазмы), активность фактора VIII, время XIIa-зависимого эуглобулинового лизиса (XIIa-ЗЭЛ), ; растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) этаноловым и орто-фенантролиновым методами, активность плазминогена амидолитическим методом, уровень D-димеров методом латексной агглютинации. Исследовали также показатели времени

электрокоагулограммы (ЭЛКГ), характеризующие общий коагуляционный потенциал крови в динамике: T_1 , T_2 и T . Показатель A_{\min} – минимальная амплитуда характеризует плотность фибринового сгустка. Степень тромбоцитопении оценивали по количеству тромбоцитов: легкая – $61-100 \times 10^9/\text{л}$, умеренная – $21-60 \times 10^9/\text{л}$, глубокая – $<10-20 \times 10^9/\text{л}$ [1].

Оценили состояние гемостаза больных ОПЛ при манифестации заболевания. При постановке диагноза у больных преобладали тяжелые геморрагии - III и IV типов, составившие 70% (таблица 2).

Таблица 2 - Геморрагический синдром у больных ОПЛ при диагностике заболевания

Симптомы	n (%)
Петехии и экхимозы на конечностях и туловище	21 (52,5)
Спонтанные и постинъекционные гематомы	31 (77,5)
Десневые кровотечения	8 (20)
Носовые кровотечения	13 (32,5)
Геморрагии в ротовой полости	22 (55)
Геморрагии на лице, кровоизлияния в склеру глаз	7 (17,5)
Ангиоретинопатия	4 из 5, осмотренных окулистом
ЖКТ-кровотечения	8 (20)
Маточные кровотечения	8 (20)
Макрогематурия	5 (12,5)
Кровоизлияния в головной мозг	2 (5)

В таблице 3 представлены показатели состояния гемостаза у пациентов с ОПЛ при манифестации заболевания. Были выявлены изменения показателей скрининговых тестов: удлинение времени свертывания крови, снижение ПТИ, уровня фибриногена, увеличение тромбинового индекса, указывающие на потребление прокоагулянтов в результате внутрисосудистого свертывания крови. Время ХПа-ЗЭЛ составило $13,5 \pm 1,4$ мин. и было удлинено по сравнению с нормальным диапазоном ($p < 0,001$), что при наличии гипофибриногенемии не исключает первичную активацию фибринолиза. Повышение уровня таких показателей, как РФМК, D-димеров, а также снижение активности плазминогена и ф. VIII у 26% больных, уменьшение концентрации фибриногена являются как следствием ДВС-синдрома, так и активации фибринолиза. Таким образом, фибринолиз при ОПЛ имеет смешанную природу: первичный и вторичный. Количество тромбоцитов у больных было снижено, причем у 24 (60%) из них до уровня менее $20 \times 10^9/\text{л}$ (тяжелая тромбоцитопения); длительность кровотечения удлинена.

Таблица 3 - Показатели коагуляционного гемостаза у больных ОПЛ при диагностике заболевания ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые лица n=30	Больные ОПЛ n=40	p
Индекс АПТВ	1,05±0,02	1,1±0,03	>0,05
ПТИ	103,8±0,9	79,8±2,1	<0,001
Индекс ТВ	1,03±0,02	1,4±0,12	<0,05
Фибриноген, г/л	2,9±0,2	1,75±0,1	<0,001
Ф. VIII, %	105,4±4,9	136,3±10,6	<0,05
ХПа-ЗЭЛ, мин	7,8±0,5	13,5±1,4	<0,001
Плазминоген, %	98,8±3,5	100±14,6	>0,05
Amin ЭЛКГ	0,2±0,002	1,5±0,3	<0,001
РФМК в этанол. тесте n(%)	Отриц.	Полож.34 (87,1)	<0,001
РФМК в ортофен. тесте мкг/мл	39,0±2,1	114,8±21,6	<0,001
D-димеры - нг/мл, n (%)	<500	500-1000 – 1 (9,1) >1000 –10 (90,9)	<0,001
Длительность кровотечения, мин	2,2±0,1	9,4±1,4	<0,001
Тромбоциты ×10 ⁹ /л	231,0±8,1	Me=10 (5-140)	<0,001

Примечание: Me –медиана

Проведено сравнение влияния индукционной ПХТ (1 группа) и протоколов лечения, комбинирующих АТРА и ПХТ (2 группа) на показатели коагуляционного гемостаза. У лиц 1 группы наблюдалось достоверное снижение показателей, характеризующих коагуляционный потенциал крови, таких, как ПТИ (74±2,3 и 82,3±2,4; p<0,05), количество фибриногена (1,7±0,2 и 2,3±0,2; p<0,05), активность фактора VIII (67±13,3 и 145,2± 16,6; p<0,005) на 3-4 дни лечения. У больных 2 группы, лечение которых начиналось с монотерапии АТРА в среднем в течение 4-х дней, напротив, отмечено повышение перечисленных показателей. В этой группе была выше также плотность фибринового сгустка (p<0,05), а количество РФМК в этаноловом тесте – ниже (p<0,05) по сравнению с показателями 1 группы.

На 5-7 дни терапии у этих больных выявлены: меньший индекс АПТВ (p<0,05), более высокое количество тромбоцитов (p<0,05), более низкий уровень РФМК в этаноловом тесте (p<0,05). Таким образом, начало комбинированных протоколов с моно-АТРА терапии позволило предотвратить так называемый “протеолитический взрыв”, привело к коррекции ряда показателей коагулограммы в первые 3-4 дня лечения, тогда как проведение лишь ПХТ вызывало усиление нарушений в системе гемостаза.

При анализе данных до лечения и на 14 и 21 дни терапии (парный критерий Стьюдента) во 2 группе выявлено продолжение корректирующего влияния АТРА на коагулопатию больных. Значение ПТИ сохранило тенденцию к дальнейшему повышению до $87,9 \pm 4,0\%$ и до $92,7 \pm 2,1\%$ соответственно ($p < 0,05$). Концентрация фибриногена увеличилась до $2,5 \pm 0,2$ г/л на 14 ($p < 0,05$) и до $3,5 \pm 0,2$ г/л - на 21 дни ($p < 0,001$). Преимущество больных 2 группы по тестам, характеризующим коагуляционный потенциал крови (ПТИ, количество фибриногена), было выявлено далее – на 28 день лечения и в ремиссии.

Время ХПа-3ЭЛ больных обеих групп имело тенденцию к удлинению на всем протяжении индукционного периода и было увеличено даже в ремиссии по сравнению с нормой ($52,4 \pm 13,1$ мин – 1 группа и $30,6 \pm 6,5$ мин – 2 группа; $p < 0,001$), что характеризовало снижение способности к активации Хагеман-зависимого фибринолиза в процессе проведения терапии.

У пациентов 2 группы уровень РФМК в этаноловом тесте сохранялся достоверно ниже, чем в 1 в течение 2 недель ($p < 0,05$) и резко повысился к 21 дню лечения. О сохранении активации свертывающей системы крови у больных 2 группы свидетельствовало и количество РФМК в ортофенантролиновом тесте, которое после некоторого снижения на 7 день вновь повысилось к 21 дню, в то время как уровень D-димеров у них прогрессивно снижался (рисунок 1). Это связано с более выраженным подавляющим действием АТРА на гиперфибринолиз, чем на прокоагулянтную активность.

После проведения курсов консолидации у больных 2 группы были выявлены более высокие результаты тестов, отражающих коагуляционный потенциал крови: ПТИ и количество фибриногена ($p < 0,05$). Фибриновый сгусток у них также был более плотным ($p < 0,05$). Не исключено, что пациенты 2 группы имеют больше компенсаторных возможностей системы гемостаза, благодаря протективному влиянию АТРА на нее в индукционный период. После терапии консолидации у больных обеих групп была определена достоверно повышенная активность фактора VIII, удлиненное время ХПа-3ЭЛ; у 50-70% наблюдавшихся отмечено увеличение РФМК ($p < 0,001$). Таким образом, полной нормализации показателей гемостаза в этот период не наблюдалось.

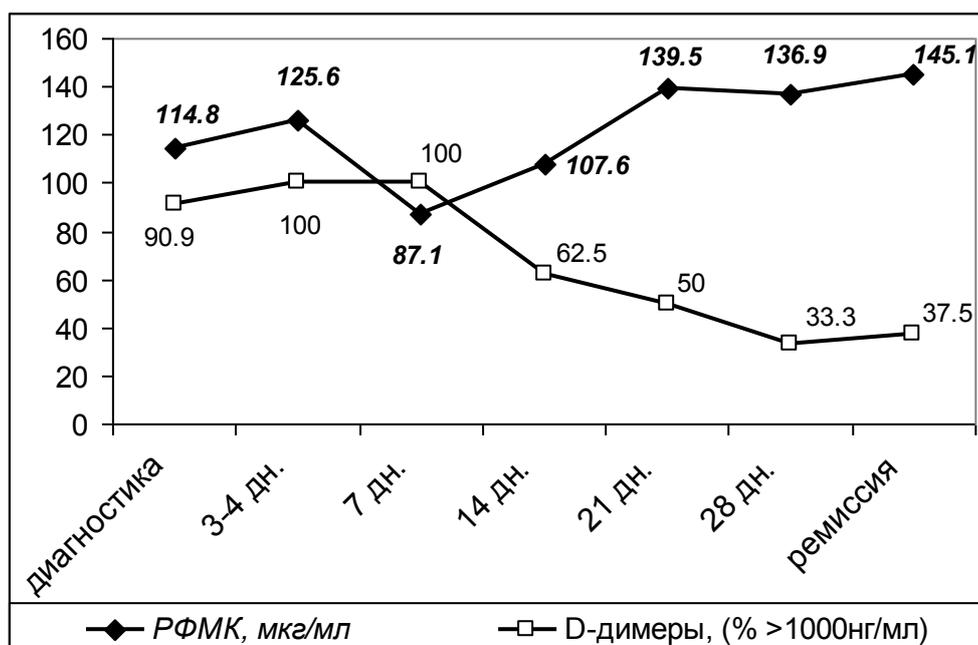


Рисунок 1. Динамика уровней РФМК и D-димеров у больных ОПЛ, получавших АТРА.

Начало ПХТ у лиц 1 группы вызвало выраженное усиление ГС, в то время как у пациентов 2, получавших комбинацию АТРА+ПХТ, наблюдалось снижение интенсивности геморрагий на первой неделе лечения ($p < 0,05$). На протяжении всей индукционной терапии ГС был менее выражен у лиц 2 группы, чем 1. При оценке состояния пациентов через 5-7 дней от начала индукционной терапии выявлено достоверное преобладание наиболее тяжелых геморрагий IV типа в 1 группе лиц: 87,5% против 28,6% ($p < 0,05$). Следовательно, проведение ПХТ у больных 1 группы способствовало усилению тяжести геморрагических проявлений, а при комбинации АТРА и ПХТ у пациентов 2 группы отмечено снижение процента тяжелых геморрагий на более отягощенном исходном фоне. Это следует объяснить корригирующим действием АТРА на коагулопатию больных ОПЛ и при комбинации ее с ПХТ. На 14 и 21 дни терапии достоверного различия в выраженности ГС у больных двух групп не было выявлено, однако, отмечена тенденция к более легким проявлениям кровоточивости у больных 2 группы. Продолжительность тяжелой тромбоцитопении у них также была короче: 6,3 против 14,8 дней ($p < 0,05$.)

Потребность в заместительной терапии во время проведения индукции ремиссии у больных 1 и 2 групп представлена в таблице 4. Из приведенных данных видно, что у пациентов, получавших АТРА, выявлено снижение потребности в концентрате тромбоцитов (КТ) и эритроцитной массе (ЭрМ), по сравнению с таковыми, находившимися только на ПХТ: $34,7 \pm 4,7$ против $80,5 \pm 15,0$ ед. КТ ($p < 0,005$) и 1505 ± 476 против 3807 ± 244 мл эритроцитной массы ($p < 0,001$) соответственно. Следовательно, использование АТРА в комбинации с ПХТ имеет не только клинические, но и экономические преимущества, обусловленные снижением объемов трансфузий компонентов

крови. Кроме того, снижается риск передачи возбудителей гемотрансмиссивных инфекций.

Таблица 4 - Объемы компонентов крови, применяемые с заместительной целью, у больных 1 и 2 групп в различные периоды индукционной терапии

Периоды терапии	Группы больных	Компоненты крови		
		КТ, ед	ЭрМ, мл	СЗП, мл
7 день	1 группа n=14	14,1±2,7	1099±126	3574±479
	2 группа n=21	12,1±1,8	362±62 ***	3924±389
14 день	1 группа n=14	19,5±2,5	872±126	2494±382
	2 группа n=14	9,9±1,5**	414±82**	2191±424
21 день	1 группа n=11	16,0±2,9	764±120	1838±452
	2 группа n=14	9,4±2,4	274±52 ***	1838± 324
28 день	1 группа n=9	9,8±3,3	564±120	1978±632
	2 группа n=9	2,2±1,0*	290±87	360±208
Всего	1 группа n=14	80,5±15	3807±244	9694± 1620
	2 группа n=21	34,7±4,7 **	1506±476 ***	7672± 1057

Примечание: * - различие с уровнем достоверности $p < 0,05$, ** - различие с уровнем достоверности $p < 0,005$, *** - различие с уровнем достоверности $p < 0,001$.

На основании приведенных исследований сделаны следующие заключения:

- Нарушения коагуляционного гемостаза у больных ОПЛ обусловлены активацией как свертывающей системы крови, так и фибринолиза. При индукции ремиссии по протоколам, комбинирующим АТРА и ПХТ, коррекция коагулопатии, а также купирование ГС происходит раньше в отличие от проведения только ПХТ.
- Применение АТРА у больных ОПЛ сокращает длительность тяжелой тромбоцитопении ($p < 0,05$), а также объемы требуемых трансфузий концентрата тромбоцитов ($p < 0,05$) и эритроцитарной массы ($p < 0,001$) примерно в 2 раза.

- У 85,7% больных применение АТРА во время терапии индукции ОПЛ в течение 30-45 дней приводит к состоянию гиперкоагуляции.

Список литературы

1. Аграненко, В.А. Клиника тромбоцитопенических геморрагий// Румянцев А.Г. Клиническая трансфузиология [Текст]/ А.Г. Румянцев, В.А. Аграненко. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1998. – С. 127-129.
2. Савченко, В.Г. Острый промиелоцитарный лейкоз [Текст] / В.Г.Савченко, Е.Н.Паровичникова, М., Литтера, 2010. – 208с.
3. Черепанова, В.В. Диагностика и коррекция осложнений современной программной химиотерапии острых лейкозов [Текст]: автореф. дис. ... докт. мед. наук.: 14.00.29 / Черепанова Валентина Васильевна. – М., 2004. – 43с.
4. Черепанова, В.В. Нарушения гемостаза у больных острым миелобластным лейкозом в процессе полихимиотерапии [Текст] / В.В.Черепанова, Н.Н. Перевалова, Л.Н. Тарасова [и др.]// Гематология и трансфузиология. – 2004. – №5. – С.27–33.
5. Falanga, A. Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells [Text] / A. Falanga, R. Consonni, M. Marchetti [et al.]// Blood. – 1998. – Vol.92,№1. – P.143-151.
6. Falanga, A. Management of thrombohemorrhagic syndromes (THS) in hematologic malignancies [Text] / A. Falanga, F.R. Rickles // Hematology. – 2007. – №1. – P.165-171.
7. Tallman, M.S. How I treat acute promyelocytic leukemia [Text] / M.S. Tallman, J.K.Altman // Blood. – 2009. – Vol.114. – P.5126-5135.
8. Rego, E.M. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL [Text] / E.M.Rego, H.T. Kim, G.J. Ruiz-Argüelles [et al.] // Blood. – 2013. - Vol.121(11). – P.1935-1943.
9. Sanz, M.A. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet [Text] / M.A.Sanz, D.Grimwade, M.S.Tallman et al. // Blood. – 2009. - Vol. 113, № 9. - P. 1875-1891.